

**Biochemische Charakterisierung des archäischen Argonaute-
Proteins aus *Methanocaldococcus jannaschii* und
strukturelle Untersuchungen mit Einzelmolekül-Förster-
Resonanz-Energie-Transfer-Studien**



Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der Fakultät für Biologie und
vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von

Adrian Zander

aus

Schönebeck (Elbe)

im Jahr

2016

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von:

Prof. Dr. Dina Grohmann

Unterschrift:

Meinen Eltern

Inhalt

1.1.	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	7
1.2.	Generelle Eigenschaften der Argonaute-Proteine und RNA-Interferenz.....	7
1.3.	Humane RNA-Interferenz	14
1.4.	Prokaryotische Argonaute-Proteine.....	17
1.5.	Das CRISPR-cas-System.....	21
1.6.	Förster-Resonanz-Energie-Transfer	23
1.7.	Fluoreszenzbasierte Einzelmolekülmessungen	25
1.8.	Ortsspezifische Markierung von Proteinen	30
1.9.	Zielsetzung	34
2.	Material	35
2.1.	Medien	35
2.2.	Antibiotika (1000x Stammlösung)	37
2.3.	Induktionsmittel (1000x Stammlösung)	38
2.4.	Puffer für Gelelektrophoresen	38
2.5.	Färbelösungen	40
2.6.	Puffer für FPLC-basierte Chromatographien, Aufschluss, Aktivitäts-, Bindungs- und Einzelmolekülfluoreszenzenergietransferversuche	41
2.7.	Verwendete Oligonukleotide	41
2.8.	Verwendete Plasmide.....	43
2.9.	Genutzte <i>E. coli</i> -stämmen.....	44
2.10.	Größenstandards für Gelelektrophoresen	44
3.	Methoden	48
3.1.	Klonierung und Lagerung von <i>E. coli</i>	48
3.1.1.	Ortsgerichtete Mutagenese des MjAgo-Gens	48
3.1.2.	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i>	49
3.1.3.	Erstellung von Glycerinkulturen zur Dauerlagerung	49
3.2.	Gewinnung und Konzentrationsbestimmung von DNA	49
3.2.1.	Extraktion von Plasmiden aus <i>E. coli</i>	49
3.2.2.	Extraktion genomischer DNA aus <i>Methanocaldococcus jannaschii</i>	50
3.2.3.	Genomische DNA aus <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> und <i>Pyrococcus furiosus</i>	50
3.2.4.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen.....	50
3.2.5.	DNA-Fällung	50
3.3.	Expression	50
3.3.1.	Wildtypprotein und MjAgo ^{E541A}	50

3.3.2.	MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure.....	51
3.4.	Extraktion und Purifikation von MjAgo	51
3.4.1.	Zellaufschluss und Hitzedenaturierung der <i>E. coli</i> -Proteine	51
3.4.2.	Chromatographische Reinigung von MjAgo mittels IMAC.....	52
3.4.3.	Größenausschlusschromatographie	52
3.5.	Techniken für Aktivitäts- und Bindungsstudien von MjAgo	53
3.5.1.	Native und denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese [PAGE]	53
3.5.2.	Native und denaturierende Agarosegelelektrophorese	54
3.5.3.	Denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese mit Sequenziergelen	55
3.5.4.	Aktivitätsassays von MjAgo mit Visualisierung durch Sequenziergel.....	56
3.5.5.	Aktivitätsassays von MjAgo mit Visualisierung durch Agarosegelelektrophorese.....	57
3.5.6.	Gelverzögerungsexperimente	59
3.6.	Konfokale fluoreszenzbasierte Einzelmolekülmessungen [LabView-Software-Ursprung herausfinden, leakage- und direct excitation-berechnung nachschauen]	60
3.7.	Western Blot	66
3.8.	Homologiemodell	67
4.	Ergebnisse	68
4.1.	Expression, Aufreinigung und Fluorophorkopplung an MjAgo	68
4.2.	Bindungsfähigkeit und Aktivitätsbestimmung von MjAgo	71
4.2.1.	Nukleinsäurebindungsfähigkeit von MjAgo	72
4.2.2.	Nukleaseaktivität von MjAgo	73
4.3.	Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Das erste Nukleotid des Leitstrangs.....	77
4.4.	Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Phosphate.....	81
4.5.	Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Länge der Nukleinsäuren, Überhänge und Abbaurichtung	83
4.6.	Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Änderung der vollständigen Sequenz	88
4.7.	Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Plasmide und genomische DNA	91
4.8.	Restrukturierung bei DNA-Bindung.....	98
5.	Diskussion	105
5.1.	Aufreinigung und Expression	105
5.2.	Identifikation der nukleolytischen Aktivität	105
5.3.	Two-State model.....	108
5.4.	Einfluss terminaler Phosphate.....	110
5.5.	Einfluss 5'-terminaler Nukleotide	112
5.6.	Prozessierung zirkulärer DNA	114

5.7. Einordnung als Defensivsystem.....	117
5.8. Ausblick.....	120
6. Quellenverzeichnis	123
7. Anhang.....	144

Abbildungsverzeichnis

Nummer	Bezeichnung	Seite
1.2-1	hAgo2-Struktur	9
1.2-2	MID-PIWI-Lobus des humanen Argonautes	10
1.2-3	N-PAZ-Lobus	12
1.3-1	Generierung und Einbau von siRNA und miRNA	15
1.3-2	Schematische Darstellung der Geinaktivierung durch Argonaute	16
1.4-1	Strukturvergleich eines prokaryotischen und eukaryotischen Argonautes	18
1.6-1	Photophysikalische Grundlagen	23
1.6-2	FRET-Farbstoffabstandsabhängigkeit	24
1.7-1	ALEX-FRET-Mikroskop	26
1.7-2	ALEX-TIRF-Mikroskop	28
1.7-3	Molekülsortierung	30
1.8-1	Einbau einer unnatürlichen Aminosäure	32
1.8-2	Reaktionsgleichung der Staudinger-Bertozzi-Gleichung	34
2.8-1	Übersicht über die verwendeten Vektoren	44
2.10-1	Verwendete Marker	45
3.4.3-1	Schematische Darstellung der Größenausschlusschromatographie	53
3.5.2-1	Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese	55
3.6-1	Bedeutung der angewandten Filter für die Auswertung der Messung	64
3.6-2	Aufklärung der Dynamik	65
4.1-1	Isolation des MjAgo-Wildtyps	69
4.1-2	Positionen der unnatürlichen Aminosäuren im Homologiemodell MjAgos	70
4.1-3	Markierungsnachweis	71
4.2.1-1	Bindungsassay von MjAgo mit DNA und RNA	72
4.2.1-2	Bindungsassay von MjAgo mit T-Leitstrang	73
4.2.2-1	Aktivitätsassay von MjAgo bei verschiedenen Reaktionstemperaturen	74
4.2.2-2	Aktivitätsassay von MjAgo mit DNA und RNA sowie deren Hybriden	75
4.2.2-3	Aktivitätsassay von MjAgo mit und ohne Leitstrang	77
4.3-1	Einfluss des ersten Nukleotids	78
4.3-2	Vergleich der Umsatzrate MjAgos in Abhängigkeit vom 5'-Nukleotid	79
4.3-3	Einfluss des zweiten Nukleotids	80
4.4-1	Einfluss der Phosphatposition auf das Schnittverhalten MjAgos	82
4.5-1	Unterschiedliche Leitstrang-Längen	84
4.5-2	Bevorzugte Seite des Abbaus	85
4.5-3	Einfluss der Überhänge	87
4.6-1	Einfluss der Sequenz auf das Prozessierungsverhalten von MjAgo	89
4.6-2	Übersicht über den Einfluss der verschiedenen Modifikationen der DNA auf das Prozessierungsverhalten	91
4.7-1	Prozessierung von plasmidaler und genomischer DNA	93
4.7-2	Prozessierung plasmidaler DNA bei unterschiedlichen Temperaturen und unter Zusatz von EDTA	95
4.7-3	Prozessierung plasmidaler DNA mit Einsatz von Leitsträngen	96
4.7-4	Immunoblot von MjAgo	98
4.8-1	Positionierung des 3'-Endes des Leitstrangs	100
4.8-2	Positionierung des mittleren Bereiches des Leitstrangs	102
4.8-3	Stabilitätsanalyse der erhaltenen ternären Komplexe	103
5.2-1	Schematische Prozessierung des Konstrukts langer Leit-/kurzer Zielstrang	106
5.3-1	Schematische Darstellung des Two-state-Modells	109
5.6-1	Darstellung der Oberflächenladung von MjAgo	117
5.7-1	Schematische Darstellung des Mechanismus der Selbstbeschleunigung	119
7.3-1	Bindungsassay von MjAgo mit T-Leitstrang	141
7.4-1	SDS-PAGE mit Coomassiefärbung der Elutionsfraktionen der IMAC der MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure	142

Abkürzungsverzeichnis

Mj :	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>
MjAgo:	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> Argonaute
RNAi:	RNA-Interferenz
piRNAs:	Piwi- <i>interacting</i> RNAs
PAZ:	PIWI-Argonaute-Zwille
MID:	Middle
PIWI:	<i>P</i> element-induced wimpy testis
miRISC:	microRNA-induced silencing complex
TtAgo:	<i>Thermus thermophilus</i> Argonaute
RsAgo:	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> Argonaute
NcAgo:	<i>Neurospora crassa</i> Argonaute
siRNAs:	<i>small interfering</i> RNAs
miRNA:	microRNA
RISC:	RNA-induced silencing complex
pri-miRNA:	<i>precursor</i> -miRNA
3'-UTR:	3'-nicht-translatierte Region
pAgo:	prokaryotische Argonaute-Proteine
eAgo:	eukaryotische Argonaute-Proteine
PfAgo:	<i>Pyrococcus furiosus</i> Argonaute
NgAgo:	<i>Natrononbacterium gregoryi</i> Argonaute
MpAgo:	<i>Marinitoga piezophila</i> Argonaute
R-M:	Restriktions-Modifikationssystem
TA:	Toxin-Antitoxin
CRISPR:	<i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
FRET:	Förster-Resonanz-Energie-Transfer
TIRF:	<i>Total internal reflection</i>
CCD:	<i>charge coupled device</i>
PIFE:	<i>protein induced fluorescence enhancement</i>
PIE:	<i>pulsed interleaved excitation</i>
FCS:	<i>fluorescence correlation spectroscopy</i>
FCCS:	<i>fluorescence cross-correlation spectroscopy</i>
MjTyrRS:	<i>Methanocaldococcus jannaschii</i> Tyrosyl-tRNA-Synthetase

CuAAC:	<i>copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition</i>
GFP:	<i>green fluorescing protein</i>
SOB:	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC:	<i>Super Optimal Broth</i> mit katabolischer Repression
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
TAE:	Tris-Acetat-EDTA
TBE:	Tris-Borat-EDTA
NaGT:	Natrium-Glyzerin-Tris
aaRS:	Aminoacyl-tRNA-Synthetase
IMAC:	<i>Immobilized Metal Affinity Chromatography</i>
AzF:	p-Azido-L-phenylalanin
bzw:	beziehungsweise
Abb:	Abbildung
Tab:	Tabelle

1. Einleitung

1.1. *Methanocaldococcus jannaschii*

Im Jahre 1977 wurden von Woese und Fox die ersten Prokaryotengruppen in phylogenetische Bäume anhand ihrer ribosomalen RNA aufgeteilt.¹ Um die Trennung dieser Prokaryotengruppen voneinander deutlich zu machen, wurden 1990 die drei Domänen des Lebens Eukaryoten, Bakterien und Archäen eingeführt.²

Archäen können weltweit in allen Habitaten, von heißen Tiefseequellen über stark mineralhaltigen Gewässern bis zum lebenden Menschen, gefunden werden.³ Es wird eine ebenso breite Verteilung der Metabolismen gefunden, mit Sonnenlicht sowie anorganischen und organischen Stoffen als Energielieferanten, allerdings wurde bisher keine Photosynthese von elementarem Sauerstoff gefunden.^{4,5}

Archäen stehen den Eukaryoten genetisch näher als den Bakterien.^{6,7} Eukaryotische Gene sind sowohl archäellen als auch bakteriellen Ursprungs, andere Gene sind exklusiv den Eukaryoten vorbehalten.⁸ Ein gemeinsamer Vorfahre von Archäen und Eukaryoten, genannt Lokiarchaeota, unterstreicht diese enge Verwandtschaft, da in diesem bereits für Eukaryoten spezifische Gene existieren.⁶

Methanocaldococcus jannaschii (Mj), dessen Argonaute-Protein (MjAgo) in dieser Arbeit betrachtet werden soll, ist ein thermophiles, methanogenes Archäon aus dem Phylum der Euryarchaeota, welches an einer hydrothermalen Tiefseequelle gefunden wurde.⁹ Sein Genom war das erste archäelle Genom, das vollständig sequenziert wurde.¹⁰ Die evolutionäre Nähe zu den Eukaryoten ermöglicht es, Proteine aus diesem Organismus als Modellsysteme zu betrachten, um das Verständnis der Mechanismen, deren Proteine eine hohe Konservierung zwischen den archäellen und eukaryotischen Varianten aufweisen, vertiefen zu können. Desweiteren können die Anpassungen an die Anforderungen der Umgebung, der verfügbaren Ressourcen und evolutionärer Druck durch virale Belastung einzigartige Veränderungen in den zu untersuchenden Mechanismen hervorbringen, deren Verständnis zusammen mit dem eukaryotischen Modell zur allgemeinen Aufklärung ihrer Wirkungsweise und Spezifität dienen kann. MjAgo weist eine Sequenzidentität von 23% zum humanen Argonaute2 auf. Zusammen mit der Struktur von *Pyrococcus furiosus*-Argonaute (PDB 1Z25) konnte ein Homologiemodell erstellt werden, welches strukturelle Untersuchungen ohne Kristallstruktur ermöglicht.

1.2. Generelle Eigenschaften der Argonaute-Proteine und RNA-Interferenz

Argonaute-Proteine sind in allen Domänen des Lebens zu finden. Ihre erste Beschreibung fanden sie in einer Studie über *Arabidopsis thaliana*-Mutanten. Dort zeigten Mutanten mit Defekten im Argonaute-System ein ungewöhnliches Wachstum, welches zu einer Ähnlichkeit der Pflanze mit einem Tintenfisch führte, sodass der betroffenen Proteinfamilie der Name Argonaute zugeordnet wurde.¹¹ Die Argonaute-Proteine wurden anschließend als zentrale Akteure der RNA-Interferenz (RNAi) erkannt. Das RNAi-System nutzt kurze, einzelsträngige RNAs zur post-transkriptionalen Geninaktivierung durch Paarung mit komplementären Abschnitten der mRNA.

Zum jetzigen Zeitpunkt sind drei Arten von Argonaute-Proteinen bekannt. Dabei handelt es sich zum einen um die PIWI-Proteine, die Homologe zum *Drosophila melanogaster* Piwi darstellen und mit Piwi-interacting RNAs (piRNAs) Transposonen in Keimzellen unterdrücken.¹² Desweiteren existieren die auf *Arabidopsis thaliana* AGO1 zurück gehende Klasse der AGO-Proteine und die in *Caenorhabditis elegans* gefundene WAGO-Klasse.^{13,14} Es soll in dieser Arbeit nur auf die AGO-Proteine eingegangen werden, welche aus vier Domänen sowie zwei Linkerregionen bestehen.

In diesen bildet die N-terminale zusammen mit der PAZ-(PIWI-Argonaute-Zwille)-Domäne einen Lobus, MID- (*Middle*) und PIWI- (*P element-induced wimpy testis*)-Domäne einen zweiten Lobus, verbunden durch die Linker-Regionen L1 und L2.

Die PIWI-Domäne nimmt eine der RNA-DNA-Hybrid schneidenden RNaseH ähnliche Faltung ein.^{15–19} Eine für die RNase H-Familie typische, konservierte katalytische Tetrade innerhalb der PIWI-Domäne sorgt für die Endonukleaseaktivität der schnittfähigen Argonauten. Diese besteht aus dem DEDX-Motiv, mit X = D, N oder H.^{16,18–21} Die Neuorientierung von L1 durch Formung des binären (eukaryotische Argonauten) bzw. ternären (prokaryotische Argonauten) Komplexes aus Argonaute, Leitstrang und ggf. Zielstrang ermöglicht die Repositionierung von L2, sodass eine Glutamatseitenkette in die katalytische Tasche eingebracht und vervollständigt werden kann.^{20,22,23} Zusätzlich wird die endonukleolytische Aktivität durch ein Mg^{2+} -Ion vermittelt. Die entstehenden Produkte der Degradation von Nukleinsäuren

durch ein Argonaute weisen ein 5'-Phosphat und eine 3'-Hydroxylgruppe auf.^{25,26} Bindung des Nukleinsäureduplex erfolgt in einer großen, positiv geladenen Tasche, sodass die zu spaltende Bindung direkt am aktiven Zentrum positioniert ist.¹⁶ Argonaute-assoziierte Proteine mit Glycin-Tryptophan-reichen Regionen (GW-Proteine) können mit der PIWI-

Domäne interagieren und den miRISC-(microRNA-induced silencing complex)-mRNA-Komplex den allgemeinen mRNA-Degradationsmechanismen zuführen.^{21,27,24}

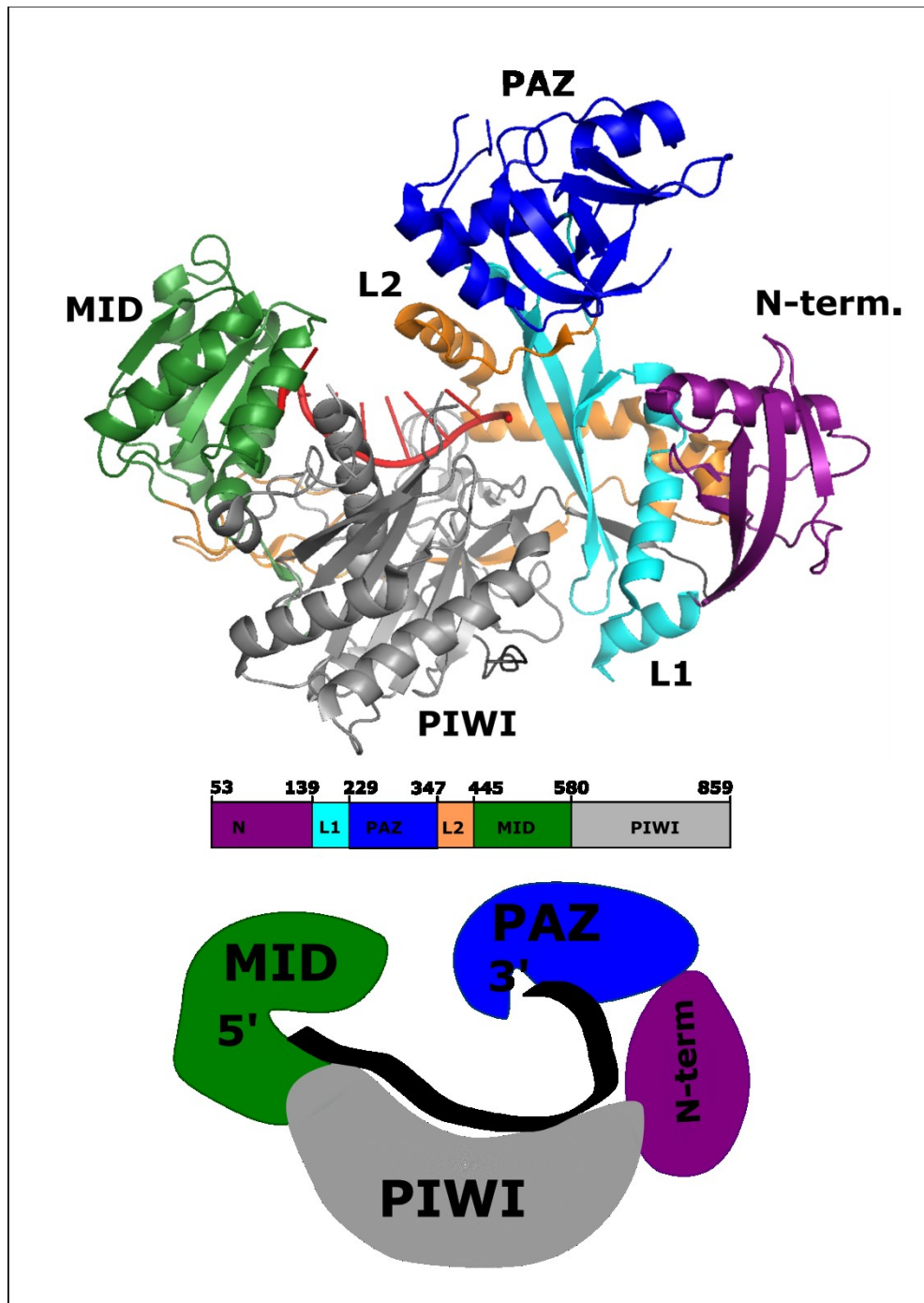


Abb. 1.2-1. hAgo2-Struktur. Kristallstruktur des humanen Argonaute2 (PDB: 4OLB, entnommen aus Schirle et al.²⁴) mit siRNA-Nukleotiden 1-8 (rot), mit der PAZ-Domäne in blau, der N-terminalen Domäne in violett, Linker 1 (L1) in hellblau, Linker 2 (L2) in orange, der PIWI-Domäne in grau und der MID-Domäne in grün. Darunter eine schematische Darstellung der Domänen mit einzelsträngiger Nukleinsäure.

Die Inaktivierung der GW-Proteine in Säugerzellen führte deshalb zu einer reduzierten Effizienz der miRNA-vermittelten Translationsrepression.²⁷ Es konnte darüber hinaus

gezeigt werden, dass eine rekombinante, isolierte PIWI-Domäne allein in der Lage ist, Nukleinsäuren zu binden und zu prozessieren.²⁸ Durch den Austausch der PIWI-Domäne des katalytisch inaktiven humanen Ago1 mit der PIWI-Domäne eines aktiven Argonautes konnte eine katalytische Aktivität für Ago1 erhalten werden.²⁹

Bei der PAZ-Domäne handelt es sich um eine hochflexible Domäne aus charakteristischen α -helikalen und β -Faltblatt-Subdomänen.¹⁷ Im binären Komplex wird das 3'-Ende des Leitstrangs in einer Bindetasche der PAZ-Domäne gebunden.^{18,22}

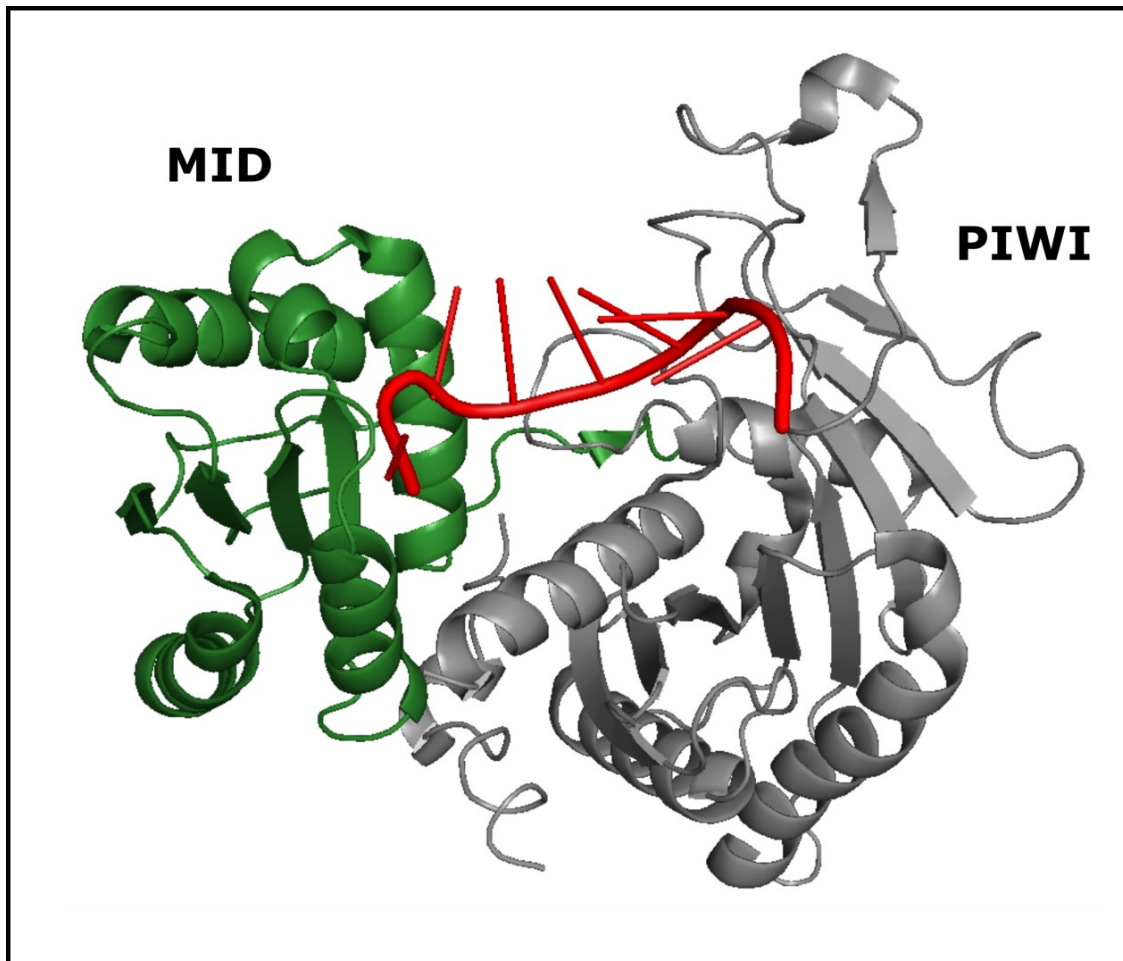


Abb. 1.2-2. MID-PIWI-Lobus des humanen Argonautes. Abbildung erzeugt aus PDB 4OLB. In grün ist die MID-Domäne dargestellt, die PIWI-Domäne in grau. Die aufgelösten Nukleotide der gebundenen siRNA (rot) sind in der MID-Domäne gebunden.

Diese Bindetasche weist eine Oligonukleotid-/Oligosaccharid-bindende Faltung (engl. *OB fold*) auf, die durch konservierte aromatische Aminosäuren spezifisch 3'-Enden einzelsträngiger Nukleinsäuren bindet.¹⁶ Bindung des Zielstrangs führt zur Entlassung des 3'-Endes des Leitstrangs,^{21,30} wobei eine Dynamik zwischen PAZ-gebundener und PAZ-ungebundener Form im ternären Komplex von *Thermus thermophilus* Argonaute (TtAgo)

durch Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfer-Studien gezeigt werden konnte.³¹ Während der Beladung von Argonaute zum Zeitpunkt der Bildung des RISC unterstützt die PAZ-Domäne die Entwindung der Nukleinsäureduplexe.³² Durch Mutationsstudien sowie der Kristallstruktur von *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute (RsAgo) konnte gezeigt werden, dass die PAZ-Domäne für die Bindung des mittleren Bereiches des Leitstrangs verantwortlich ist.³³ Diese Form der Bindung konnte für eukaryotische Argonaute-Proteine noch nicht beobachtet werden, da dieser Bereich bisher in Kristallstrukturen nicht aufgelöst werden konnte. Die konservierte Helix-7 wird zusammen mit der PAZ-Domäne als starrer Körper relativ zu MID-, PIWI- und N-terminaler Domäne bewegt, sodass der von der N-terminalen und PAZ-Domäne gebildete Bindungskanal während der Formung des ternären Komplexes geöffnet werden kann.³⁴ Dies ermöglicht erst die Bindung der Nukleinsäuren.

Die MID-Domäne nimmt eine Rossmann-artige Faltung ein, mit parallelen β -Faltblättern eingerahmt von α -Helices.^{21,35,36} In eukaryotischen Zellen interagiert das GW182-Protein mit der MID-Domäne. Mutationen in der MID-Domäne von *Neurospora crassa* Argonaute (NcAgo) verhinderten diese Interaktion und unterbanden damit die Geninaktivierung durch Argonaute.³⁷ In der MID-Domäne befindet sich die Bindungstasche für die Bindung des 5'-Endes des Leitstrangs.^{17-19,36,38,39} Störungen der Integrität der MID-Domäne unterbinden die Geninaktivierungsfähigkeit Argonauten ebenfalls.⁴⁰ Desweiteren wird das 5'-Phosphat des Leitstrangs durch ein von der MID- sowie der PIWI-Domäne koordiniertes Magnesiumion stabilisiert.^{19,35,38-40} Im *Neurospora crassa* Argonaute wurde eine zweite Bindungstasche gefunden, welche sich mit der ersten zwei bindungsrelevante Lysine teilt.²¹ Es wird vermutet, dass durch allosterische Wechselwirkungen bei Bindung des Leitstrangs eine Bindung der m⁷GpppG-Bindungsdomäne des eukaryotischen Translations-Initiations-Faktors eIF4E möglich ist.^{21,41} Die Bindetasche der MID-Domäne einiger Argonauten weist anhand ihrer Struktur eine Präferenz für bestimmte Nukleotide auf, welche sodann in Präzipitationsstudien vermehrt am 5'-Ende des Leitstrangs gefunden werden.^{18,33,42,43} Es konnte allerdings auch eine vom 5'-Nukleotid unabhängige Bindung nachgewiesen werden.⁴⁴ Zusätzlich zur MID-Bindetasche findet unter anderem in *Thermus thermophilus* Argonaute, *Drosophila melanogaster* Argonaute, *Arabidopsis thaliana* Argonaute und den humanen Argonauten eine Sortierung der Leitstränge anhand ihres 5'-Nukleotids durch die Nukleotid-Spezifitätsschleife (engl. *nucleotide specificity loop*)

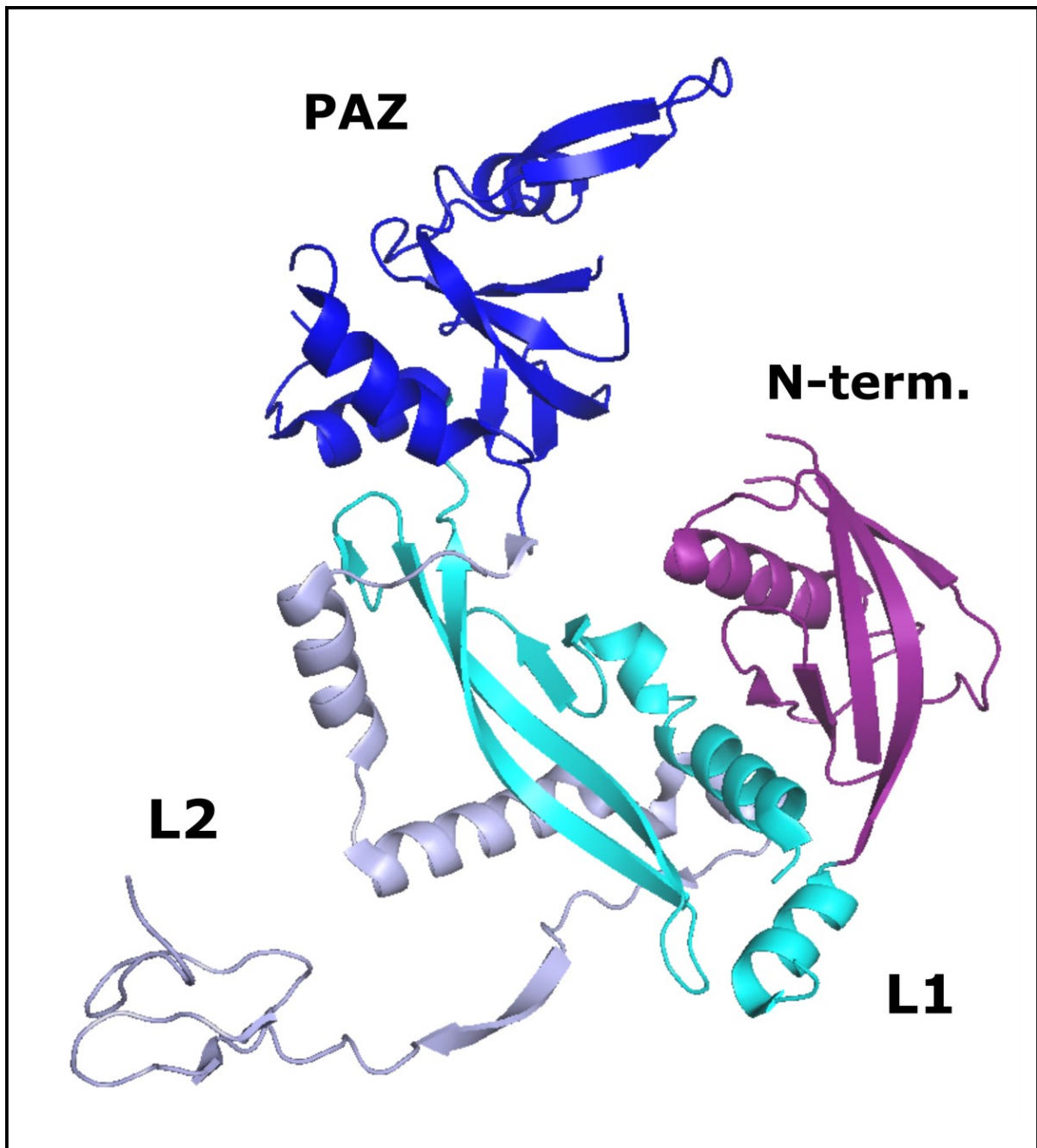


Abb. 1.2-3. N-PAZ-lobus. N-terminale (violett) und PAZ-Domäne (blau) mit den Linkern L1 (hellblau) und L2 (silberblau). Abbildung erzeugt aus PDB 4OLB.

Diese stabilisiert die präferierten Nukleotide durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Nukleobase und den Aminosäuren der Schleife, während unpräferierte Nukleotide zur Abstoßung führen, sodass eine Auswahl der Nukleinsäuren getroffen werden kann.³⁵

Die N-terminale Domäne verhindert die Watson-Crick-Paarung der gebundenen Nukleinsäuren im 3'-Bereich des Leitstrangs.^{46,47} Desweiteren entwindet diese in humanen Zellen den Duplex der Nukleinsäuren während der Bildung des RISC.⁴⁸ Dieses System ist nicht in allen Argonauten konserviert, die Basenpaarung in RsAgo findet auch am 3'-Ende des Leitstrangs statt.³³

Für die Bindung der Nukleinsäuren und deren Erkennung ist die sogenannte Seed-Region von besonderer Bedeutung. Intensive Wechselwirkungen, bestehend aus Wasserstoffbrückenbindungen sowie ionischer Wechselwirkungen zwischen Argonaute und dem Phosphatrückgrat der Nukleinsäure und Van-der-Waals-Wechselwirkungen zur Ribose, zwischen Leitstrang und Protein im Bereich der Nukleotide 2-8 stabilisieren den Argonaute-Nukleinsäure-Komplex^{24,49-52} und führen zu weitreichenden allosterischen Wechselwirkungen.^{17,18} Durch die Wechselwirkungen des Proteins mit dem Phosphatrückgrat wird eine hohe Sequenzpromiskuität gewährleistet.^{18-20,24,39,44} Die Struktur des Leitstrangs außerhalb der Seed-Region ist überwiegend ungeordnet.^{24,40,53} Innerhalb der Seed-Region sind die Nukleotide in einer A-Form vorkonfiguriert, mit den zur Watson-Crick-Paarung fähigen Oberflächen von der Proteinseite wegzeigend, sodass die entropischen Kosten zur Bildung eines Duplex mit dem Zielstrang reduziert werden.^{18,20,24,38-40,54} Die Bindung des Zielstrangs unter Einnahme der A-Form mit konsekutiver Basenstapelung führt zur gleichzeitigen Entlassung des 3'-Endes des Leitstrangs aus der PAZ-Domäne und, sofern das jeweilige Protein katalytische Aktivität aufweist, Adaption einer zur Prozessierung des Zielstrangs befähigten Konformation.^{30,53,55} Zwischen Nukleotid 6 und 7 befindet sich im binären Komplex ein Knick, der die A-Form in dieser Region verhindert.²⁴ Während der Bindung des Zielstrangs wird die für diesen Knick verantwortliche Helix-7, die sich in der Linkerregion L2 befindet, neu positioniert, sodass der Duplex eine vollständige A-Form einnehmen kann.²⁴ Dabei wird die Bindung der Nukleinsäuren an das Protein überwiegend durch den Leitstrang und nur im geringen Maße über den Zielstrang vermittelt.⁴⁰ Eine Paarung des ersten 5'-Nukleotids des Leitstrangs mit dem 3'-Nukleotid des Zielstrangs ist nicht notwendig und kann sogar die Prozessierung verlangsamen.^{40,56} Die Bedeutung der Seed-Region entsteht aus der Tatsache, dass mobile genetische Invasoren schnell identifiziert und neutralisiert werden müssen. Eine vollständige Paarung des Leitstrangs würde diesen Prozess zu sehr verlangsamen, sodass eine vorläufige Erkennung durch die Seed-Region mit

anschließender weiterer Bindung einen ausgewogenen Mittelweg zwischen Bindungsstabilität und Erkennungsgeschwindigkeit darstellt.^{57–59}

1.3. Humane RNA-Interferenz

In humanen Zellen befinden sich vier verschiedene Argonaute-Proteine, hAgo1 bis hAgo4. Alle vier Argonauten betreiben RNA-geführte Geninaktivierung, obwohl nur hAgo2 endonukleolytische Aktivität aufweist.^{29,60,61}

Die humane RNA-Interferenz ist ein zentraler Prozess zur post-transkriptionalen Regulation der Genexpression durch ein Argonaute-Protein und kleine RNAs (*small interfering RNAs* (siRNAs), microRNAs (miRNAs), PIWI-interagierende RNAs (piRNAs) oder mirtrons).^{62–64} Diese formen zusammen mit Argonaute den *RNA-induced silencing complex* (RISC), dessen Aufgabe von der Spezies der gebundenen kleinen RNA und dem jeweiligen Argonaute abhängt.

Die meisten microRNAs werden als primäre Transkripte (pri-miRNAs) durch die RNA-Polymerase II aus dem Genom erstellt. Der die RNase III *Drosha* und das RNA-bindende Protein DGCR8 enthaltende *nuclear microprocessor complex* prozessiert die Haarnadelstruktur enthaltende pri-miRNAs und setzt diese an deren doppelsträngigem Stamm frei, sodass die precursor-miRNA (pre-miRNA) gebildet wird.^{65–69} Anschließend erfolgt der Transport ins Cytoplasma durch Exportin 5 und RanGTP.^{70,71} Das RNase III-Enzym Dicer entfernt den zyklischen Teil der Haarnadelstruktur und schafft somit eine doppelsträngige RNA von ca. 22 Basenpaaren. Nach der *asymmetry rule* wird der RNA-Strang mit dem thermodynamisch weniger stabilen 5'-Ende vom Argonaute geladen, während der Gegenstrang langsam entladen wird.^{72,73} Dabei kann Argonaute durch Dicer und TRBP mit dem Doppelstrang geladen werden.⁷⁴ Entwindung des Doppelstrangs und die daraus resultierende Möglichkeit zur Entlassung des Gegenstrangs nach Einbau des Leitstrangs erfolgt in den nicht-katalytischen Argonauten durch Einwirkung der PAZ-Domäne.³² Der RISC ist sodann zur translationalen Repression durch Bindung in der 3'-nicht-translatierten Region (3'-UTR) durch Watson-Crick-Paarung fähig.^{66,75} Ein alternativer Reifungsweg umgeht die Prozessierung durch Dicer. Die pre-miRNA wird direkt in Argonaute geladen und zur fertigen miRNA durch Argonaute prozessiert.⁷⁶ Durch miRNA translational repressierte mRNAs werden durch allgemeine mRNA-Degradationsprozesse, wie Deadenylierung und Hydrolyse des 5'-Endes der mRNA mit Freisetzung eines

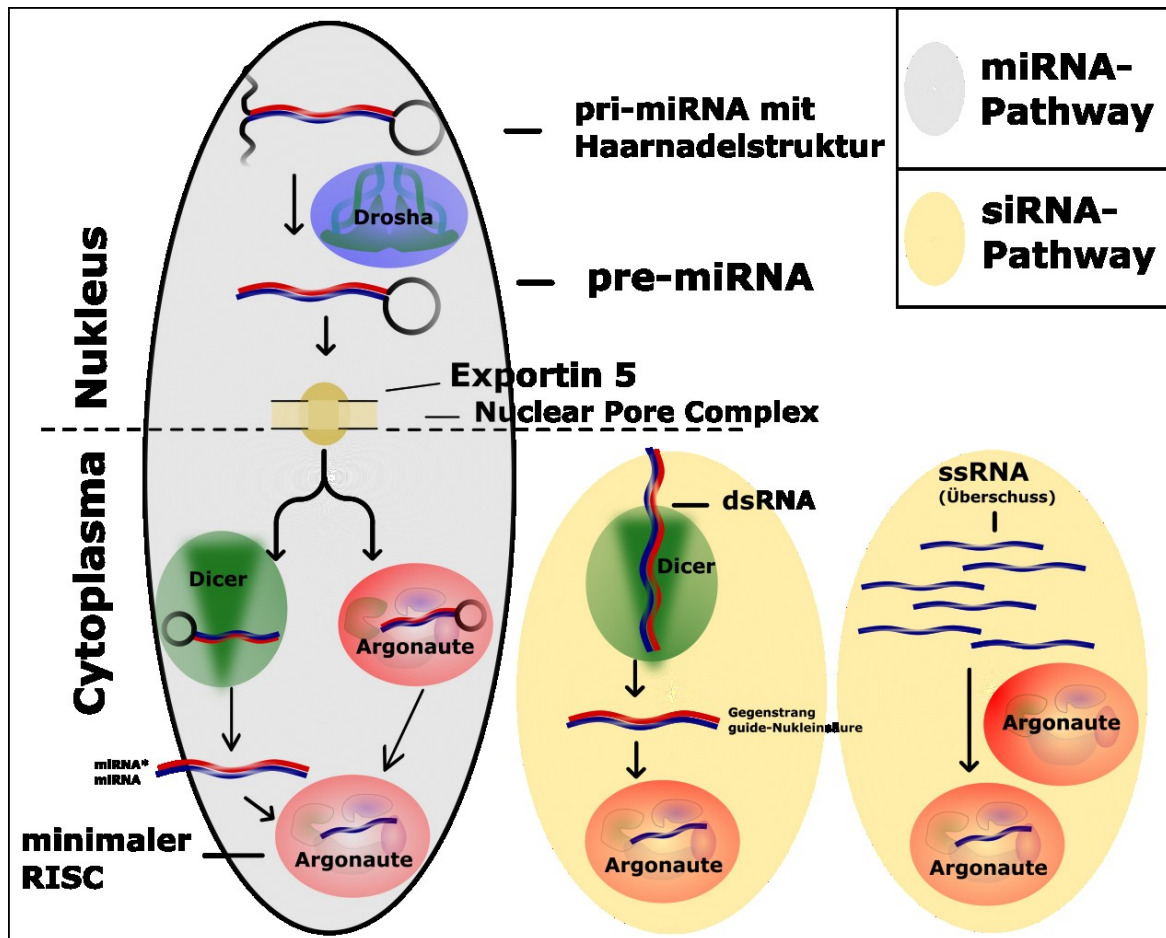


Abb. 1.3-1. Generierung und Einbau von siRNA und miRNA. Im Nukleus erzeugte pri-miRNA werden durch die RNase Drosha zu pre-miRNA prozessiert, anschließend durch Exportin 5 in das Cytoplasma transportiert und dort entweder direkt in Argonaute geladen und von diesem zur fertigen miRNA prozessiert oder zunächst durch Dicer geschnitten, sodass ein RNA-Doppelstrang entsteht. Dieser Doppelstrang wird in Argonaute geladen, wobei die miRNA* als *passenger strand* entlassen wird. siRNA-Vorläufer werden durch Dicer prozessiert und der Leitstrang wird anschließend in Argonaute geladen. Bei entsprechend hoher Konzentration kann der Leitstrang auch direkt in Argonaute geladen werden. In allen Fällen entsteht der minimale RISC aus Argonaute und einer kurzen Nukleinsäure.

siRNAs können aus einer Vielzahl von Quellen gewonnen werden. Diese sind unter anderem virale RNAs, konvergente Transkripte sowie Transposonen.⁷⁸ Die langkettigen Vorläufer werden durch Dicer prozessiert und in der gleichen Weise wie die miRNAs in Argonaute integriert.⁷⁹ Anschließend erfolgt der Schnitt des Gegenstrangs, wodurch die thermodynamische Stabilität des Duplexes stark herabgesetzt und der Gegenstrang entladen wird.⁸⁰ Die siRNA paart vollständig mit der mRNA, diese wird sodann endonukleolytisch prozessiert.⁶³ Im Gegensatz zu den miRNAs weisen siRNAs eine vollständige Komplementarität zum RNA-Zielstrang auf^{16,81,82}, wodurch die Degradation

der mRNA durch Argonaute eingeleitet wird. Desweiteren besteht die Möglichkeit, Argonaute direkt mit einzelsträngigen siRNAs zu beladen, sodass keine Prozessierung des Gegenstrangs erfolgen muss.^{63,83–86}

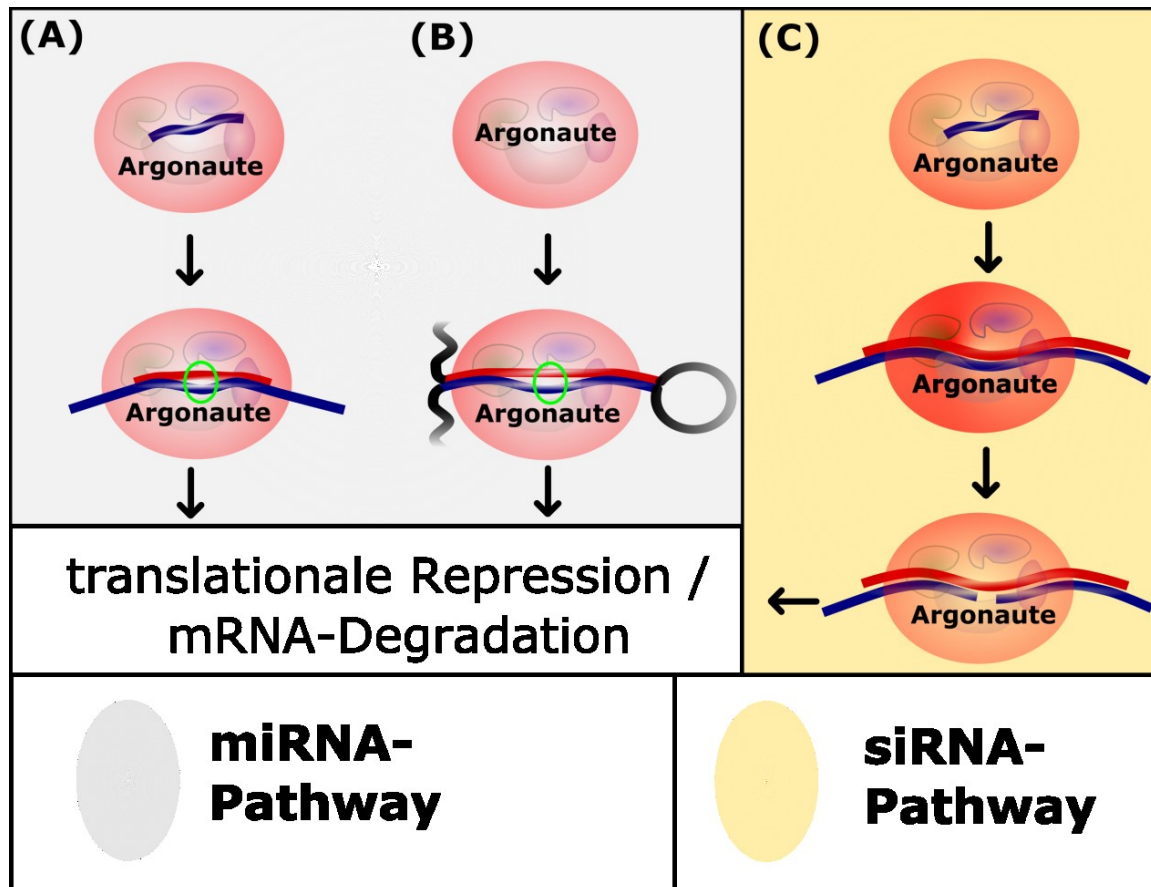


Abb. 1.3-2. Schematische Darstellung der Geninaktivierung durch Argonaute. (A) Bindung einer mRNA (blau) mit geladener miRNA (rot). Die ungepaarten Nukleotide sind grün umrahmt. (B) Direkte Interaktion von Argonaute mit einer Haarnadelstruktur einer mRNA. (C) Bindung einer mRNA (blau) durch Argonaute mit geladener siRNA (rot). Es erfolgt sodann die endonukleolytische Spaltung der mRNA.

miRNAs und siRNAs weisen durch die Prozessierung durch Dicer eine Länge von ~22 Nukleotiden auf^{83,87–89}, einen 5'-phosphorylierten Terminus sowie einen 3'-Überhang von zwei Nukleotiden gegenüber ihrem RNA-Zielstrang.⁹⁰ Das humane Argonaute2 kann darüber hinaus auch miRNA unabhängig von Dicer verarbeiten.⁷⁶ Durch Bindung an Haarnadelstrukturen der mRNA kann hAgo2 auch ohne miRNA die Translation unterdrücken.⁹¹ DNA-geführte Geninaktivierung konnte in Säugetier-Zellstudien nachgewiesen werden, ein *in vitro*-Beweis fehlt bisher.⁹²

Die Beladung des humanen Argonautes2 mit doppelsträngiger RNA benötigt sowohl den Chaperon-Komplex Hsc70/Hsp90 als auch ATP⁸⁵, Bindung einzelsträngiger RNAs findet ohne weitere Kofaktoren statt.⁸³ Kobayashi et al. schlagen einen Mechanismus vor, in dem

der stabilste Zustand des humanen Argonautes der binäre Komplex aus Argonaute und einzelsträngiger RNA darstellt, sodass alle Prozesse zur Schaffung des binären Komplexes aus dem durch die ATP-Hydrolyse gespannten ternären Komplex bzw. aus dem ungeladenen Protein die energetisch bevorzugte Konfiguration erzeugen.⁹³ Dieser Mechanismus erklärt, wie die Hydrolyse des RNA-Zielstrangs ohne weitere Energiezufuhr geschehen kann. Auch die präferierte Bindung einzelsträngiger RNA gegenüber doppelsträngiger RNA durch hAgo2, beobachtet in Fluoreszenz-basierten *stopped-flow*-Messungen, stützt diese These.⁹⁴

Die Bedeutung der humanen RNAi ergibt sich aus der theoretischen Möglichkeit, jede Translation regulieren zu können. Dadurch sind im Bereich der Onkologie, der Virenabwehr sowie neurodegenerativer Erkrankungen neuartige Therapien möglich.⁹⁵ So könnten Enzyme, die in Krebszellen im besonderen Maße exprimiert werden, auf ein für gesunde Zellen normales Level reguliert werden.⁹⁵ Gleichzeitig besteht die Notwendigkeit, das gesamte System im Detail zu verstehen, da die Toleranz in der Komplementarität zwischen miRNA und mRNA dazu führen kann, dass eine einzelne miRNA die Regulation vieler unterschiedlicher Gene beeinflussen kann.⁹⁶ Bisher unbekannte Funktionen und Arbeitsweisen der Argonaute-Proteine können zu weiteren Nebenwirkungen während der Therapie führen.

1.4. Prokaryotische Argonaute-Proteine

Prokaryotische Argonaute-Proteine (pAgos) sind in ~32% der sequenzierten archäellen Genome codiert, aber nur zu ~9% in den bakteriellen Genomen.²³ Die Präsenz der PAZ-Domäne lässt dabei eine Einteilung in eine PAZ-Domänen enthaltende Gruppe, die überwiegend katalytisch aktive Argonauten enthält, sowie eine PAZ-freie Gruppe zu, welche überwiegend katalytisch inaktiv ist. Die Operons, in denen die Argonauten der zweiten Gruppe zu finden sind, enthalten vorhergesagte Nukleasen, während diese Nukleasen nicht in Operons mit katalytisch aktiven Argonaute-Varianten zu finden sind. Ein Argonaute-geführter Nukleasekomplex zur Abwehr invasiver genetischer Elemente ist deswegen anzunehmen. Bekannte Gene prokaryotischer Immunsysteme werden in enger Nachbarschaft zueinander, genannt *defense islands*, gefunden, Argonaute-codierende Gene befinden sich innerhalb dieser *defense islands*.^{97,98}

Obwohl zwischen prokaryotischen und eukaryotischen Argonaute-Domänen ein hoher Grad an struktureller Konservierung herrscht,⁵³ ist die Sequenzidentität zwischen pAgos und eukaryotischen Agos (eAgos) gering.²³ Genomische Analysen lassen auf intensiven horizontalen Gentransfer der pAgo-codierenden Gene schließen,⁹⁸ vermutlich bedingt durch den hohen evolutionären Druck durch die virale Belastung.

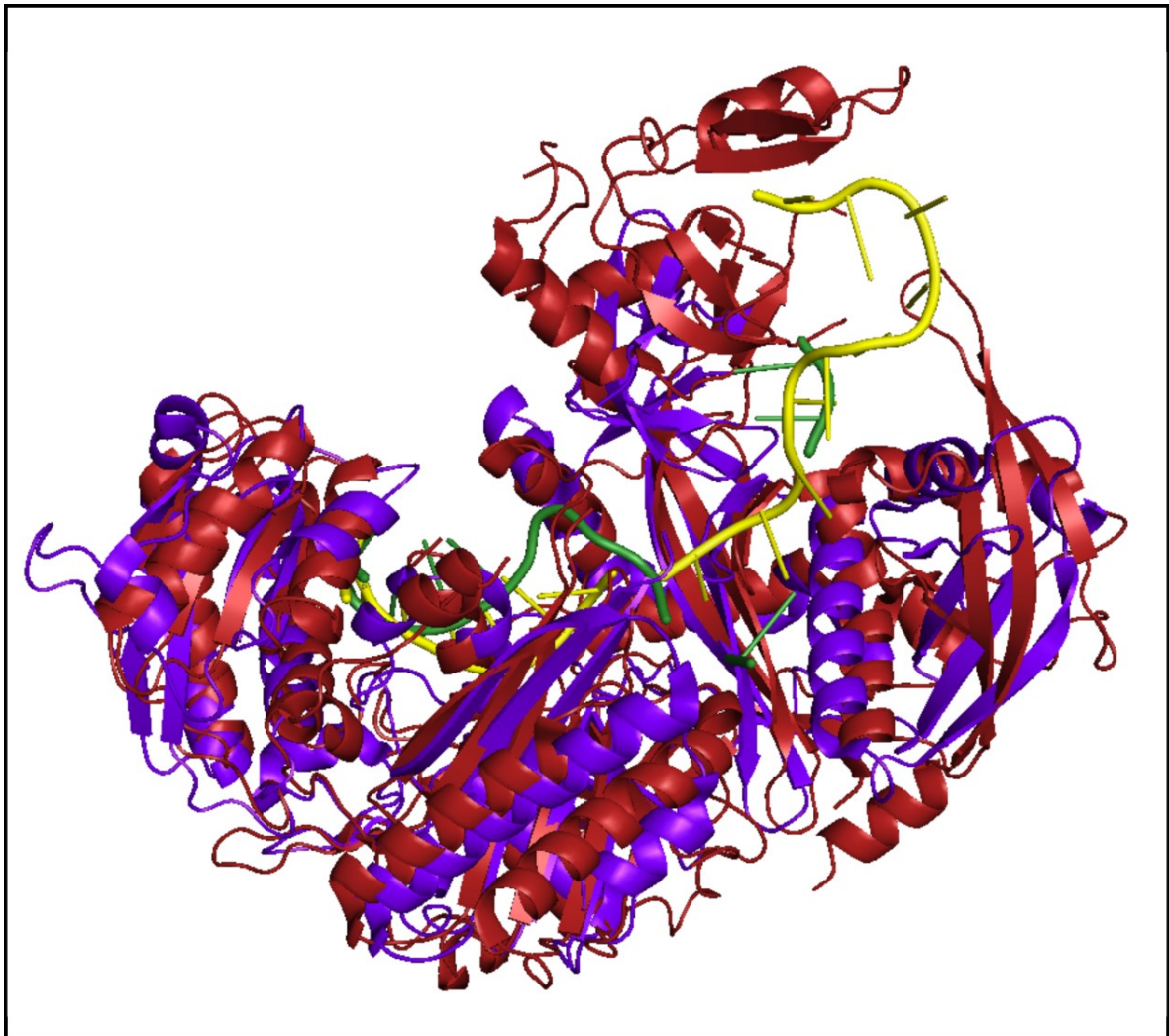


Abb. 1.4-1. Strukturvergleich eines prokaryotischen und eukaryotischen Argonautes. Beispielhafte Überlagerung der Struktur des humanen Argonaute2 (rot) mit gebundener siRNA in gelb (PDB: 4W5N) und des archäellen *Marinitoga piezophila* Argonaute (violett) mit gebundener ssRNA in grün (PDB: 5I4A). Die einzelnen Domänen weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf, die PAZ-Domäne weist in der Gesamtstruktur eine deutlich unterschiedliche Position zwischen den beiden Argonaute-Vertretern auf. Zwischen beiden Proteinen herrscht eine Sequenzidentität von 21% (BLAST).

Im Gegensatz zu eukaryotischen Argonauten werden von pAgos nicht exklusiv RNA-Leitstränge verwendet,²³ sondern auch DNA-Leitstränge und DNA-Zielstränge.^{38–40,99} Die daraus entstehende DNA-Interferenz wird sowohl für die Argonauten der archäellen Organismen *Pyrococcus furiosus* (PfAgo),¹⁰⁰ *Natronobacterium gregoryi* (NgAgo)¹⁰¹ und

*Methanocaldococcus jannaschii*³⁰ gefunden, als auch für bakteriellen Vertreter wie *Thermus thermophilus* (TtAgo).¹⁰² In Immunopräzipitationsstudien mit rekombinantem *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute (RsAgo) wurden gebundene DNA-Fragmente gefunden, die in Größe und Struktur den eigentlich bevorzugten RNA-Leitsträngen ähneln. Ebenfalls wurde eine Abnahme des Expressionsplasmids bei Überexpression von RsAgo beobachtet. Dies zeigt die Fähigkeit eines bakteriellen Argonauten, sowohl DNA- als auch RNA-geführte DNA-Interferenz zu betreiben.¹⁰³ In Argonaute gebundene Fragmente, die einem Plasmid zugeordnet werden können, wurden auch bei TtAgo, PfAgo und NgAgo bei Immunopräzipitationen rekombinanter Expressionen gefunden.^{23,100,101} In allen Fällen konnte nicht bestimmt werden, woher die notwendigen Leitstränge stammen.

Tab. 1.4-1. Übersicht über die Substrate prokaryotischer Argonauten. Nukl.: Nukleinsäure; Plasmide in vitro: Degradation von Plasmiden in vitro nachgewiesen; Plasmide in vivo-IP: Fragmente von degradiertem Plasmid gebunden an Argonaute durch Immunopräzipitation nachgewiesen; nein bedeutet dabei, dass kein entsprechender Versuch mit positivem Ergebnis veröffentlicht wurde.

Organismus	Domäne	Leit-strang	Ziel-strang	5'-Ende Leitstrang	Plasmide In vitro	Plasmide In vivo-IP	Quelle
<i>Thermus thermophilus</i>	Bakterien	DNA	DNA	Phosphat	gezeigt	gezeigt	⁴³
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Archäen	DNA	DNA	Phosphat	gezeigt	gezeigt	¹⁰⁰
<i>Aquifex aeolicus</i>	Archäen	DNA/RNA	RNA	Phosphat	nein	nein	¹⁷
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Bakterien	DNA/RNA	DNA/RNA	Phosphat	nein	gezeigt	¹⁰⁴
<i>Natronobacterium gregoryi</i>	Archäen	DNA	DNA	Phosphat	gezeigt	nein	¹⁰¹
<i>Marinitoga piezophila</i>	Bakterien	RNA	DNA/RNA	Hydroxyl-gruppe	nein	nein	⁴⁴

Eine Möglichkeit wäre die Bereitstellung entsprechender Nukleinsäuren aus Prozessen des zur Expression genutzten *Escherichia coli* (*E. coli*), allerdings wären die einzigen, bekannten Quellen kurzer DNA-Fragmente die Okazaki-Fragmente. Diese haben allerdings eine Größe von 1 bis 2 kb in Bakterien und ca. 100 Basen in Archäen,¹⁰⁵ sodass eine weitere Prozessierung vor der Nutzung durch Argonaute notwendig wäre. Denkbar wäre auch eine

Prozessierung von längerkettigen Vorläuferrukleinsäuren durch das jeweilige Argonaute, ein experimenteller Nachweis dessen ist bisher nicht erfolgt.

In silico wurden in Bakterien und Archäen reverse Transkriptasen gefunden, deren Aufgaben nicht vollständig geklärt wurden,¹⁰⁶ eine Bereitstellung von DNA-Leitsträngen für das Argonaute-System kann nicht ausgeschlossen werden. *In vitro* konnte für TtAgo, PfAgo und NgAgo die Prozessierung von Plasmiden unter Einwirkung eines DNA-Leitstrangs gezeigt werden.^{43,100,101} Dabei fand allerdings nur ein Schnitt des Plasmids statt, eine Bildung von Fragmenten konnte nicht gezeigt werden. Mit der Ausnahme des bakteriellen *Marinitoga piezophila* Argonaute (MpAgo) bevorzugen alle bekannten pAgos einen Leitstrang mit 5'-Phosphatgruppe (Tabelle 1.4-1).

Die äußerst ausgeprägte virale Belastung der Prokaryoten (ungefähr im Verhältnis Phagen:Bakterien 1:10¹⁰⁷) ist eine treibende Kraft der Evolution.¹⁰⁸ Dabei sind Mechanismen entstanden, die zum jetzigen Zeitpunkt in die zwei Gruppen der immanenten und adaptierten Immunsysteme aufgeteilt werden können. Das immanente Restriktions-Modifikationssystem [R-M] verwendet dabei die Erkennung von zelleigenem und zellfremden genetischen Material durch Restriktionsenzyme, die bestimmte Methylierungen oder Phosphothioationen als wirtseigen erkennen und deshalb nicht degradieren.^{109,110} Wird das Genom eines unmethylierten Phagen durch zelleigene Methylasen nach Eindringen in die Zelle methyliert, erfolgt allerdings keine Erkennung durch das R-M-System, sodass eine Infektion der Zelle stattfindet. Durch Methylierung des Genoms der entstehenden Phagen sind die R-M-Systeme anderer Zellen, die auf dem gleichen Erkennungsmuster beruhen, nicht mehr im Stande, eine Infektion abzuwehren.¹¹¹ Desweiteren werden Erkennungssequenzen für zelleigene Endonukleasen mutiert, sodass das Phagengenom nicht mehr angegriffen werden kann.¹¹² Die Adaption der benötigten Methylasen durch die Phagen ist eine weitere Möglichkeit, dass R-M-System zu umgehen.¹¹³ Der evolutionäre Druck, der durch diese und weitere Mechanismen erzeugt wird, hat ein adaptiertes Immunsystem hervorgebracht, welches durch das CRISPR-System bereitgestellt wird. Dieses integriert zellfremdes genetisches Material stabil in CRISPR-Loci und liefert somit eine spezifische Immunantwort bei einer weiteren Infektion (s. 1.5). Desweiteren existiert das Toxin-Antitoxin-(TA)-System, in dem ein stabiles Toxin durch ein instabiles Antitoxin blockiert wird.¹¹⁴ So kann unter anderem der Prophage des Bacteriophagen P1 in *E. coli* durch Bindung der N-terminalen Region des *Prevent Host*

Death-Antitoxins an zwei palindrome Sequenzen der Promoterregion des Prophagen-Operons unterdrückt werden.¹¹⁵

Prokaryotische Argonauten können einen weiteren Teil des Immunsystems darstellen. Da sowohl RNA als auch DNA als Zielstrang prozessiert werden können, ist eine Verwendung des Systems in der Abwehr invasiver genetischer Elemente ähnlich der eukaryotischen RNA-Interferenz denkbar. Ein *in vivo*-Beweis für diese Theorie konnte noch nicht erbracht werden. Ebenso fehlt eine Quelle für die notwendigen Leitstränge, die für die Interaktion des Argonauten notwendig sind. Eine potentielle Quelle für Leitstränge sowie Hinweise auf eine biologische Rolle des Argonauten aus *Methanocaldococcus jannaschii* soll in dieser Arbeit dargestellt werden.

1.5. Das CRISPR-cas-System

In vielen Prokaryoten, nachgewiesen in ca 90% aller archäellen und ~40% aller bakteriellen Genome,^{116–118} konnte ein RNA-basiertes, adaptives Immunsystem zur Identifikation und Abwehr genetischer Parasiten nachgewiesen werden. Dieses System wurde 1987 zunächst in *Escherichia coli* beobachtet,¹¹⁹ als regelmäßige Sequenzwiederholungen (*Repeats*) entdeckt wurden, die von einzigartigen Sequenzen (*Spacer*) getrennt wurden.¹²⁰ Die *Repeats* zwischen den *Spacern* weisen zwischen 28 und 40 Basenpaaren auf.¹²⁰ Dieses Motiv aus *Spacern* und *Repeats* wird als *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* (CRISPR) bezeichnet. Dabei werden die *Spacer* mit einer Länge von 26 bis 72 Basenpaaren aus invasivem genetischen Material gewonnen und stabil in das Genom des Organismus integriert.^{121–123} Die Integration erfolgt am Anfang des Locus,¹²¹ sodass eine chronologische Auflistung der Infektions-Immunitätszyklen entsteht.¹²⁴ Der Vergleich der *Spacer* innerhalb eines CRISPR-Locus zeigt, dass keine *Spacer*-Sequenz innerhalb eines Locus doppelt auftritt.¹²³ Integration der *Spacer* führt zu einer Immunität gegen virale Angriffe, der Verlust der *Spacer* führt demnach auch zu einem Verlust der adaptierten Immunität.¹²¹ Die Immunität wird gewährleistet, indem die CRISPR-Loci transkribiert werden und die Transkripte durch CRISPR-assoziierte Proteine gebunden werden,¹²⁵ experimentell nachgewiesen durch Infektionsstudien in *Streptococcus thermophilus*.¹²¹ Die Transkripte aus dem CRISPR-Locus, welche Vorläufer-CRISPR-RNAs darstellen, werden von dem Cas-Komplex Cascade so prozessiert, dass die Sequenzen viraler Abstammung mit Unterstützung der Helicase Cas3 als RNA-Leitstränge für den Komplex Cascade dienen, welcher die virale Proliferation unterdrückt.¹²⁶ CRISPR-Interaktionen stellen somit einen

weiteren Mechanismus der RNA-geführten Geninaktivierung durch Prozessierung des DNA-Zielstrangs dar.^{127,128} Das CRISPR-cas-System arbeitet sodann in drei Stufen: CRISPR-Adaption durch Einbau eines invasiven DNA-Fragments in Form eines Spacers mit nachfolgender Transkription und Einbau des Transkripts in ein cas-Protein sowie abschließender CRISPR-Interferenz zur Abwehr des Pathogens.¹¹⁷ Es besteht die Möglichkeit, dass Fragmente aus der Prozessierung durch das R-M-System in *S. thermophilus* als *Spacer* für das CRISPR-System dienen können.¹²⁹ Die hohe Diversität der CRISPR-Cas-Systeme lässt die Einteilung in drei verschiedene Typen mit diversen Subtypen anhand jeweils eines charakteristischen Proteins zu: Typ I, welche alle die Cas3-Nuklease-Helikase enthalten, Typ II mit der Cas9-Nuklease sowie Typ III mit Cas10, dessen Funktion bisher ungeklärt ist.^{122,124} Typ II existiert exklusiv in Bakterien, Typ I und Typ III werden sowohl in bakteriellen als auch archaischen Organismen gefunden.^{122,124,130} Darin enthalten sind vorhergesagte oder beobachtete Nukleasen, Helicasen, Integrasen und Polymerasen.^{128,131} cas-Gene werden exklusiv in den Genomen gefunden, die CRISPR-Loci enthalten.¹²⁰

Die genauen Mechanismen sowie die einzelnen Aufgaben der verschiedenen cas-Proteine sind bisher nur unvollständig geklärt. Bemerkenswert sind die hochgradig konservierten Proteine Cas1 und Cas2. Diese bilden einen Komplex, der die Integration der neuen Spacer in das Genom gewährleistet,¹³² und können in allen CRISPR-Typen gefunden werden.⁹⁸ Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist die Endonuklease Cas9, welche, nach mehreren Prozessierungsschritten unter Mithilfe der Ribonuklease RNase III und einer bisher unbekannten Nuklease, eine doppelsträngige RNA von 20 Nukleotiden bindet und in der Lage ist, sodann RNA-geführt DNA-Zielstränge zu prozessieren.^{124,127,130,133}

1.6. Förster-Resonanz-Energie-Transfer

Röntgenstrukturanalyse und NMR-Techniken erlauben strukturelle Untersuchungen von biologischen Makromolekülen und ermöglichen damit Einblicke in die molekularen Mechanismen des Lebens. Die Natur dieser Methoden erlaubt allerdings nur die Betrachtung statischer Zustände, sodass sowohl dynamische Prozesse, kurzlebige Übergangszustände als auch seltene Subspezies nur schlecht oder gar nicht betrachtet werden können. Durch Nutzung fluoreszenzbasierter Einzelmolekülansätze eröffnet sich die Möglichkeit der Betrachtung dynamischer Wechselwirkungen von Proteinen und Substraten, konformationeller Reorganisation eines Proteins während seiner Aktivität und dynamischer Komplexbildung, während gleichzeitig eine in Ensemble-Messungen übliche Mittelwertbildung des jeweiligen Signals vermieden wird und somit auch Komplexe untersucht werden können, die nur wenige Prozent der Probe ausmachen.

Fluoreszenz ist die Emission von Licht nach Anregung eines Moleküls.¹³⁴ Während dieses

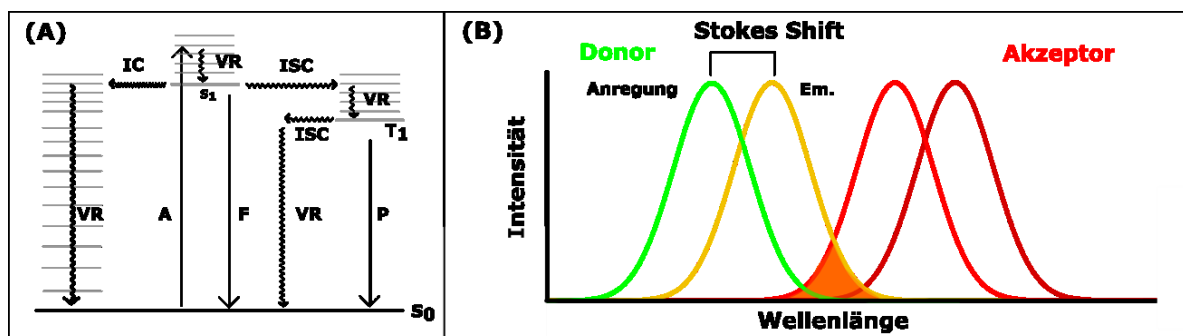


Abb. 1.6-1. Photophysikalische Grundlagen. (A) Jablonski-Diagramm zur Veranschaulichung der Vorgänge während der Aufnahme eines Photons durch einen Fluorophor. S_0 ist der Grundzustand, S_1 der erste angeregte Zustand, T_1 der Tripletzustand. VR stellt die vibronische Relaxation dar, bei der die Energie strahlungsfrei abgegeben wird. IC: *internal conversion*, strahlungsfreier Übergang in tiefergelegene elektronische Zustände. ISC: *Intersystem crossing*, Übergang aus einem angeregten Singulettzustand in einen Tripletzustand. A: Anregung. F: Fluoreszenz. P: Phosphoreszenz. (B) Schematische Darstellung des Anregungs- und Emissionsspektrums (Em.) des Donors (grün und helles orange) und des Akzeptors (rot und dunkles rot) mit Überlappungsintegral (orange) sowie Darstellung des Stokes Shift.

Vorgangs wird durch Absorption elektromagnetischer Wellen ein Elektron vom Grundzustand S_0 in einen angeregten Zustand S_1 angehoben und emittiert bei strahlender Desaktivierung ein Photon. Durch Spinumkehr ist der Übergang vom angeregten Zustand S_1 in den langlebigen Triplet-Zustand T_1 möglich, die strahlende Desaktivierung dieses Zustands wird in diesem Fall als Phosphoreszenz bezeichnet.¹³⁵ Das emittierte Licht hat

sowohl bei der Fluoreszenz als auch bei der Phosphoreszenz eine größere Wellenlänge als das absorbierte Licht. Die Anregung aus dem Grundzustand erfolgt in einen schwingungsangeregten Zustand des elektronisch angeregten Zustands. Anschließend erfolgt die Relaxation in den Schwingungsgrundzustand des elektronisch angeregten Zustands mit nachfolgender Relaxation in einen angeregten Schwingungszustand des elektronischen Grundzustands. Innerhalb des elektronischen Grundzustands erfolgt daraufhin die Relaxation in den Schwingungsgrundzustand. Demnach erfolgen Absorption und Emission zwischen verschiedenen Energiezuständen, sodass die jeweiligen Wellenlängen nicht die gleichen Werte aufweisen. Die Differenz der Maxima von Emissions- und Absorptionsspektrum ist der Stokes Shift.

Wenn das Emissionsspektrum eines angeregten Farbstoffs (Donor) mit dem Absorptionsspektrum eines weiteren Farbstoffs (Akzeptor) überlappt, findet der Förster-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) statt, ein strahlungsfreier Energieübertrag von Donor- auf Akzeptorfarbstoff durch Dipol-Dipol-Wechselwirkungen.^{136,137}

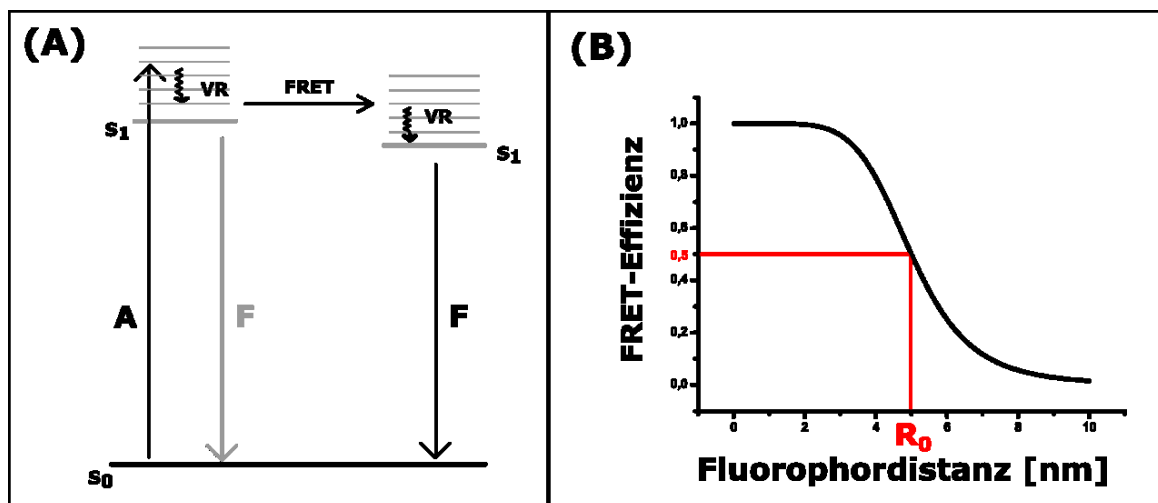


Abb. 1.6-2. FRET-Farbstoffabstandsabhängigkeit. (A) Schematische Darstellung der Anregungszustände während eines Förster-Resonanz-Energie-Transfers. S_0 ist der Grundzustand, S_1 der erste angeregte Zustand. VR stellt die vibronische Relaxation dar, bei der die Energie strahlungsfrei abgegeben wird. A: Anregung. F: Fluoreszenz. (B) Verdeutlichung der Abhängigkeit der FRET-Effizienz von der Farbstoffdistanz. R_0 ist der Försterradius und stellt den Farbstoffabstand dar, bei dem die FRET-Effizienz 50% beträgt.

Dieser findet bei einem Farbstoffabstand von zwei bis zehn Nanometer statt, sofern die Dipolmomente dieser nicht senkrecht zueinander sind.¹³⁸ Die Effizienz des Energieübertrags E hängt zum einen vom Abstand der Farbstoffe zueinander (R) und den spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Donor-Akzeptor-Paares ab.

$$E = \frac{1}{1+(R/R_0)^6} \quad (1)$$

R_0 ist der Försterradius, welcher die Distanz der Farbstoffe beschreibt, bei der die FRET-Effizienz 50% beträgt, und berechnet sich aus dem Überlappungsintegral des Donor-Emissionsspektrums mit dem Akzeptor-Absorptionsspektrum:

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \Phi_D \kappa^2}{128 \pi^5 N n^4} \int_0^\infty f_d(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (2)$$

mit Φ_D : Quantenausbeute des Donors (Quotient aus absorbierten und emittierten Photonen), N : Avogadrokonstante, n : Brechungsindex des Lösungsmittels, κ^2 : Orientierungsfaktor (Orientierung der Farbstoffdipole zueinander, als 2/3 angenommen bei uneingeschränkter Rotationsfreiheit), λ : Anregungswellenlänge, ε_A : molekularer Extinktionskoeffizient des Akzeptors, f_D : Emissionsspektrum des Donors in Abhängigkeit der Wellenlänge.¹³⁸

1.7. Fluoreszenzbasierte Einzelmolekülmessungen

Die Integration zweier Farbstoffe in ein biologisches Makromolekül oder einen Komplex an distinkten Positionen erlaubt die Bestimmung der Abstände beider Fluorophore durch die Bestimmung der FRET-Effizienz. In dieser Arbeit wurde dazu ein konfokales Einzelmolekülfluoreszenzmikroskop mit alternierender Laseranregung verwendet (Abb. 1.6-3). Dabei werden Donor- und Akzeptoranregungslicht durch einen akusto-optisch-steuerbaren Filter (*acousto-optical tunable filter*, AOTF) alterniert, sodass sowohl Donor als auch Akzeptor eines Komplexes während der Diffusion durch den Anregungsbereich mehrfach separat angeregt werden. Das Anregungsvolumen wird begrenzt, indem ein Objektiv mit hoher numerischer Appertur das Licht beugungsbegrenzt auf einen einzelnen Bereich in Lösung fokussiert. Durch Fokussierung der Fluoreszenz durch eine Lochblende mit nachfolgender Auftrennung der Signale von Donor und Akzeptor durch dichroitische Strahlteiler sowie der Verwendung von Emissionsfiltern wird die separate Detektion von Donor- und Akzeptorfluoreszenz ohne Detektion des Anregungslichtes mit einer Avalanche-Photodiode (APD) ermöglicht.^{139,140}

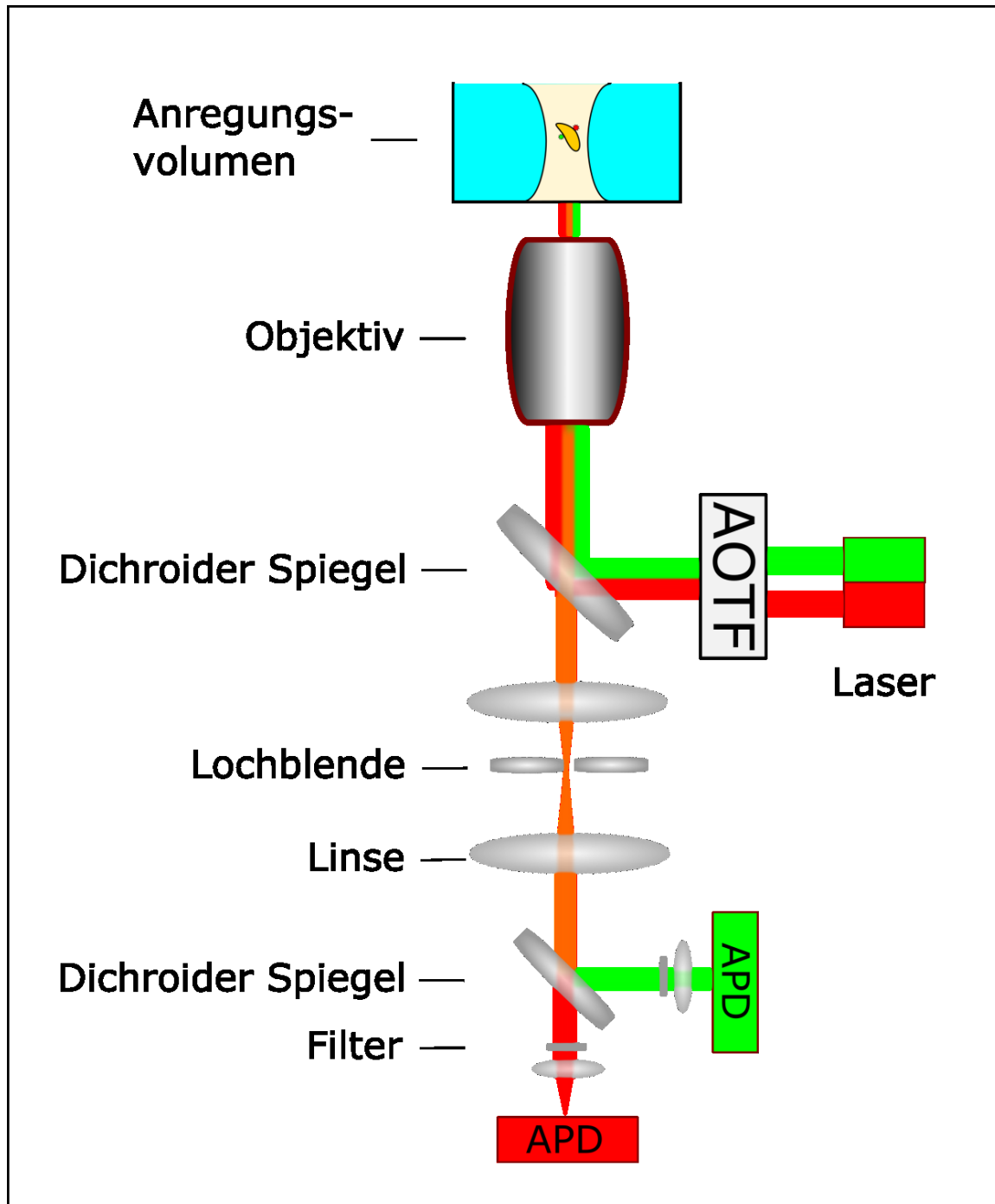


Abb. 1.7-1. ALEX-FRET-Mikroskop. Schematische Darstellung eines konfokalen Einzelmolekülfuoreszenzmikroskops mit alternierender Laseranregung. APD: Avalanche Photodiode. AOTF: *acousto-optical tunable Filter*.

Durch die alternierende Laseranregung können für jedes einzelne Molekül zwei Größen bestimmt werden. Dies ist zum einen der FRET-Effizienzwert E , der die Effizienz der Energieübertragung von Donor- auf Akzeptorfarbstoff beschreibt, zum anderen der Stöchiometriewert S , der das stöchiometrische Verhältnis der Farbstoffe im gemessenen Molekül angibt.

$$S = \frac{D_{EX}}{D_{EX} + A_{EX}} \quad (3)$$

mit D_{EX} : Anregungslicht für den Donor; A_{EX} : Anregungslicht für den Akzeptor.

Die Kombination beider Werte eröffnet die Möglichkeit, die Spezies mit einem einzelnen Fluorophor von den Spezies mit einem FRET-Paar zu sortieren, sodass auch Spezies mit geringem Anteil an allen gemessenen Molekülen separat betrachtet werden können.^{141,142}

Ein mit einem Farbstoff versehenes Molekül, welches der Molekularbewegung nach Brown in der Probenkammer unterliegt, wird beim Passieren des konfokalen Anregungsvolumens mehrfach den beiden Anregungslasern ausgesetzt. Die Detektion des emittierten Fluoreszenzlichtes findet durch separate Detektion jedes einzelnen Photons statt. Die Unterscheidung eines Molekülsignals von Hintergrundsignalen erfolgt durch die *all-photon-burst-search*-Methode. Diese identifiziert ein Molekülsignal, indem innerhalb eines Zeitbereichs T mindestens L sukzessive Photonen mindestens M benachbarte Photonen aufweisen.¹⁴³ Die Detektion der Molekülsignale erfolgt getrennt für Akzeptor- und Donorfarbstoffe.

Konfokale Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie kann sowohl für Proben angewendet werden, die frei in Lösung diffundieren, als auch für immobilisierte Proben. Immobilisierung kann beispielsweise durch Antikörper oder Biotin-Neutravidin-Wechselwirkung der Proben mit der Probenkammer erfolgen.¹³⁷ Dadurch wird die Betrachtung der Fluoreszenzfarbstoffe und damit assoziierter Zustände (z.B. Assoziation oder Dissoziation von Untereinheiten eines Komplexes, Konformationswechsel eines Proteins oder Proteinkomplexes, Bewegung eines Moleküls entlang eines DNA-Strangs^{137,144,145}) über längere Zeiträume als bei frei diffundierenden Proben möglich. Zu diesem Zweck kann die Probenkammer mit einem die biologischen Makromoleküle sowie die Farbstoffe nicht beeinflussenden Passivierungsreagenz, wie z.B. Rinderserum-Albumin (*bovine serum albumin*, BSA), passiviert werden.

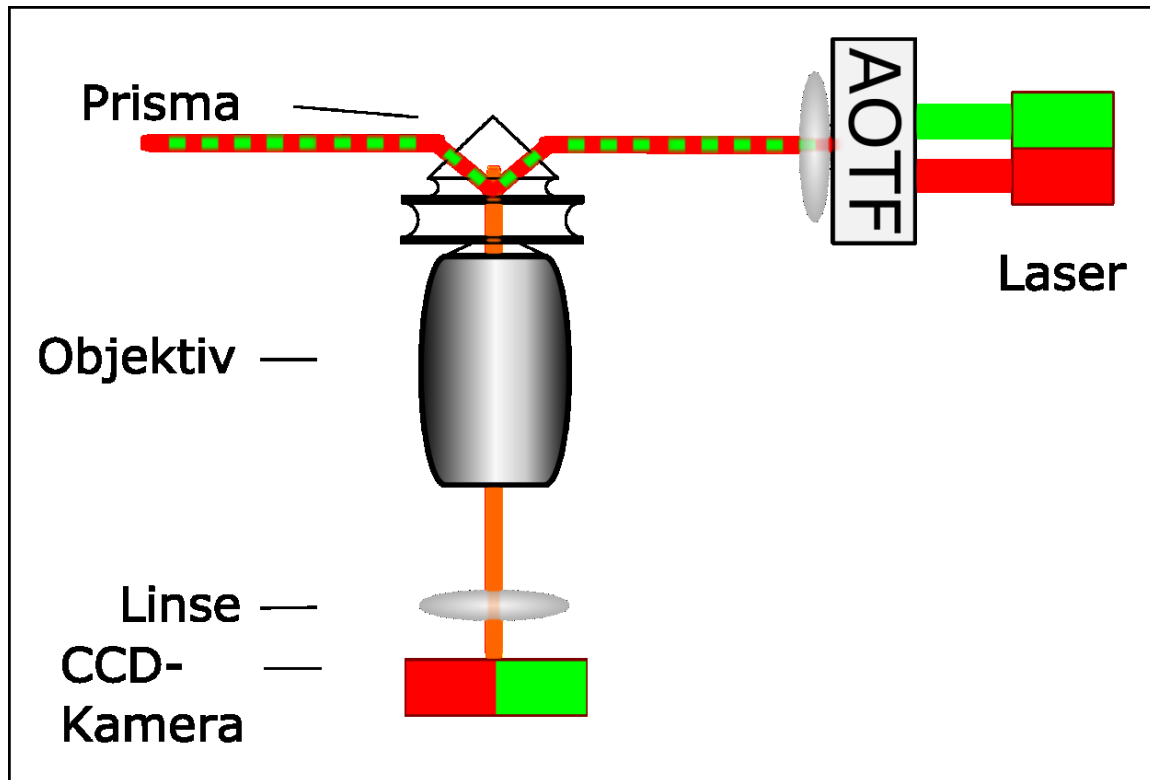


Abb. 1.7-2. ALEX-TIRF-Mikroskop. Schematische Darstellung eines *Total Internal Reflection fluorescence* Mikroskops mit alternierender Laseranregung.

Das geringe Anregungsvolumen eines konfokalen Mikroskops im Bereich weniger Femtoliter lässt nur die Betrachtung einzelner immobilisierter Moleküle zu. Die gleichzeitige Betrachtung mehrerer immobilisierter Moleküle wird durch die Verwendung eines auf totaler interner Reflexion basierenden Fluoreszenzmikroskops (*total internal reflection fluorescence*, TIRF) ermöglicht. Diese Mikroskope gehören zu den Weitfeldmikroskopen und nutzen Laser zur Illumination einer Fläche von mehreren Mikrometern Durchmesser mit anschließender Detektion des Fluoreszenzlichtes durch *charge coupled device* (CCD)-Detektoren.¹⁴⁶ Das Anregungslicht wird bei dieser Technik zunächst durch eine Linse fokussiert und von einem Prisma gebrochen. Der Einfallswinkel des Anregungslichts muss dabei größer als 63° sein, um vollständig von der von der Probe abgewandten Seite reflektiert zu werden. Es entsteht dabei auf der Probenseite ein evaneszentes, exponentiell abklingendes Feld, welches nur Farbstoffmoleküle nahe an der Oberfläche anregt. Auf diese Weise ist die Betrachtung einer größeren Fläche und damit Anzahl an immobilisierten Molekülen als mit einem konfokalen Mikroskop möglich. Gleichzeitig ist durch die Detektionstechnik ein TIRF-Mikroskop auf eine Zeitauflösung im Bereich von Millisekunden oder länger beschränkt, während auf konfokalen Techniken

beruhende Mikroskope im Bereich von Nanosekunden detektieren können. Allen Techniken gemein ist die Problematik von unspezifischen Wechselwirkungen der Proben mit den Oberflächen der Probenkammern, welche bei inkorrektur Immobilisierung zusätzlich mit den Farbstoffen interagieren können.^{137,146}

Wechselwirkungen der Farbstoffe mit der Umgebung können allerdings auch genutzt werden, um weitere Informationen zu gewinnen. Die Technik *protein-induced fluorescence enhancement* (PIFE) nutzt die Veränderungen der Quantenausbeute der Farbstoffgruppe der Cyaninfluorophore in Abhängigkeit von der jeweiligen Mikroumgebung des Farbstoffs. Sterische Hinderung des Farbstoffs durch Proteinwechselwirkungen verzögert die Photoisomerisierung in ein fluoreszenz-inaktives, angeregtes Isomer, sodass die Fluoreszenzintensität gesteigert wird, ohne die sonstigen Eigenschaften des Farbstoffs zu verändern. Dieses Verhalten des Farbstoffs verändert den Stöchiometriewert des FRET-Paares, an dem der Cyaninfluorophor beteiligt ist, und kann somit zusätzliche Informationen über die direkte Umgebung des Farbstoffs liefern, zusätzlich zum FRET-Effizienzwert, welcher in der gleichen Messung Informationen über den Abstand der beiden Farbstoffe zueinander liefert.¹⁴⁷

Weitere Informationen können durch Verwendung gepulster Laser mit zeitlicher Verschiebung zueinander gewonnen werden. Bei dem *Pulsed interleaved excitation*-Verfahren (PIE) wird die Probe zunächst durch einen gepulsten Laser mehrfach angeregt, um nach einer Verzögerung τ von einem zweiten gepulsten Laser angeregt zu werden. Es erfolgt jeweils nur die Anregung eines Farbstoffs durch einen Laser. Die Verzögerung τ ist so gewählt, dass alle emittierten Photonen nach Anregung detektiert werden können, bevor die Anregung durch den jeweils anderen Laser beginnt. Mittels dieses Vorgehens ist die eindeutige Zuordnung der Herkunft (Anregungsquelle) eines emittierten Photons durch Bestimmung des Detektionszeitpunktes (Zuordnung des Detektorkanals) möglich, sodass vom Donoranregungslicht angeregte Akzeptorfarbstoffe aus der weiteren Betrachtung herausgefiltert werden können. Durch die getrennte Betrachtung der Fluoreszenz unter direkter Anregung des Donors und des Akzeptors können mit dieser Methode Moleküle anhand ihrer Farbstoffspezies, also der Existenz von einem oder zwei bzw. mehreren Fluorophoren, ähnlich der ALEX-Methode sortiert werden. Die stark erhöhte Frequenz der Anregungsalternierung von PIE (ca. 5 MHz, Erhöhung möglich) im Vergleich zu ALEX (ca. 10 kHz) ermöglicht desweiteren die zusätzliche Nutzung von *fluorescence*

correlation spectroscopy (FCS) und *fluorescence cross-correlation spectroscopy* (FCCS). FCS nutzt eine Autokorrelationsfunktion zur Betrachtung der temporalen Abhängigkeit der Fluktuation eines Fluoreszenzsignals. Diese Fluktuationen entstehen durch Veränderungen in der Umgebung des mit einem zu beobachtenden Moleküls assoziierten Fluorophors, sodass Aussagen über aktiven Transport, Diffusion oder anomaler Diffusion sowie intermolekularer Vorgänge wie Bindungskinetiken von DNA-Strängen getroffen werden können. Der Vergleich zweier Autokorrelationsfunktionen in FCCS ermöglicht eine Zeitauflösung im Bereich unterhalb von Mikrosekunden und damit die Betrachtung von Vorgängen, die mit ALEX lediglich einen Mittelwert der Zustände ergeben würden.^{137,148–150}

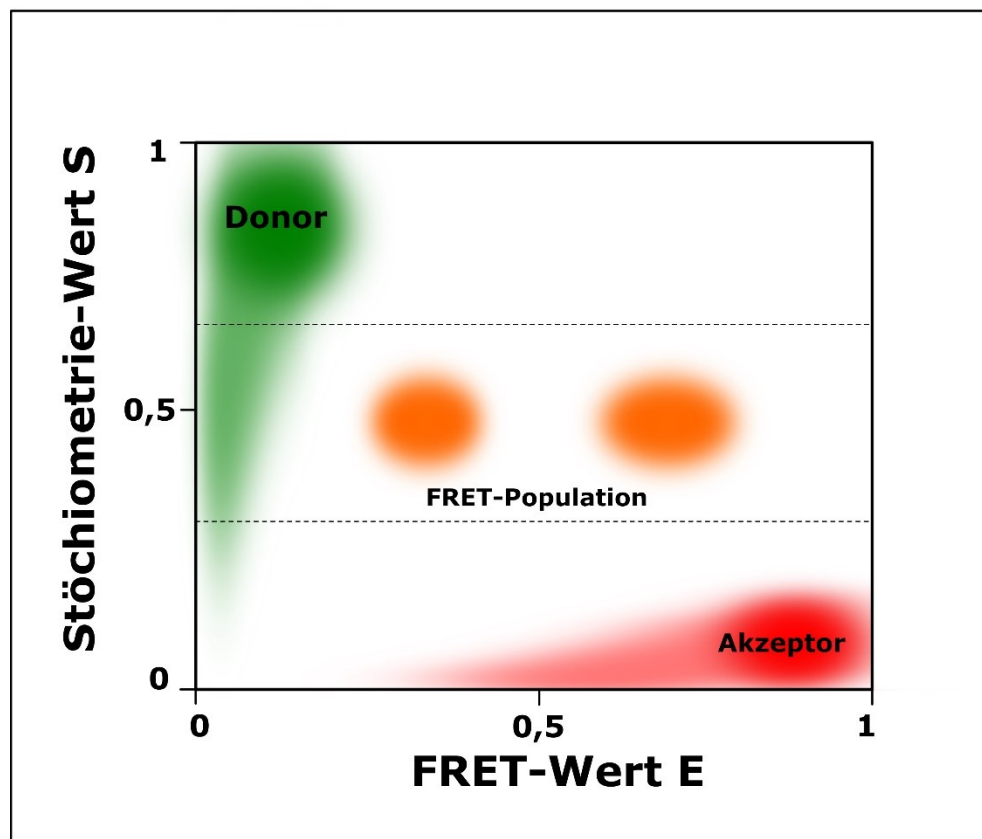


Abb. 1.7-3. Molekülsortierung. Veranschaulichung der Sortierung von Molekülen durch Kombination von Stöchiometrie- und FRET-Wert. Eine Trennung der Spezies mit geringem FRET-Wert von einer Spezies, die nur den Donor trägt, ist ohne Stöchiometriewert nicht eindeutig möglich. Das E-S-Histogramm zeigt die Auftrennung in die verschiedenen Spezies mit einem Farbstoff sowie zwei FRET-Populationen. Die gestrichelte Linie zeigt die Isolierung der FRET-Populationen durch Extraktion aller von diesen Linien eingeschlossenen Messwerte.

1.8. Ortsspezifische Markierung von Proteinen

Sofern Konformationsänderungen eines Proteins betrachtet werden sollen, muss mindestens ein Fluorophor an das Protein ortsspezifisch gekoppelt werden. Dies kann über markierte Cofaktoren erfolgen, sofern diese während der Messung stabil gebunden bleiben.^{151–153} Alternativ dazu ist eine Maleimide-Kopplung eines Farbstoffs mit der Thiolgruppe eines Cysteins möglich. Diese Methode kann nur dann ortsspezifisch werden, wenn genau ein Cystein im Protein vorliegt.^{154,155} Diese Limitierung kann mittels des Amber-Suppressor-Verfahren umgangen werden. Durch ortsgerichtete Mutagenese mit zusätzlicher Präsenz des Aminoacyl-tRNA-Synthetase/Suppressor tRNA-Paares aus Mj kann eine unnatürliche Aminosäure mit einzigartigem chemischen Verhalten spezifisch in das vollständige Protein integriert werden.^{156–159} Dazu wird das Codon, das für die durch die unnatürliche Aminosäure zu ersetzende ursprüngliche Aminosäure codiert, zum Amber-Stopp-Codon, TAG, mutiert. In *Methanocaldococcus jannaschii* codiert dieses Codon für die Aminosäure Tyrosin, während es in *E. coli* zur Rekrutierung des Abbruchfaktors RF1 und damit zum Abbruch der Translation führt.^{160,161} Die *Methanocaldococcus jannaschii* Tyrosyl-tRNA-Synthetase (MjTyrRS) amino-acyliert keine endogene *E. coli*-tRNA mit Tyrosin.¹⁵⁷ Mutationsversuche mit Positivselektion anhand der Vervollständigung der Chloramphenicolacyltransferase mit der zum Medium hinzugefügten unnatürlichen Aminosäure und damit einhergehender Resistenz gegen Chloramphenicol sowie Negativselektion mit einem von unnatürlichen Aminosäuren freien Medium durch Aussortierung aller Zelllinien, welche den unerwünschten Einbau einer endogenen Aminosäure in ein toxisches Gen mit Amber-Stopp-Codon durchführen, ergaben mutierte MjTyrRS-Varianten. Expression der korrespondierenden tRNA ermöglicht deren Aminoacylierung mit der unnatürlichen Aminosäure sowie nachfolgenden ortsgerichteten Einbau orthogonal zum Amber-Stopp-Codon während der Translation in das Protein.^{157,162,163} Dieser Prozess steht in Konkurrenz zum Translationsabbruch durch Rekrutierung von RF1. Dies führt zu einer zur Expression unvollständiger Proteine, in die die unnatürliche Aminosäure nicht integriert werden konnte. Zum anderen interferiert der Mechanismus mit den endogenen Amber-Stopp-Codons von *E. coli*. Inaktivierung von RF1 ist lethal für *E. coli*.¹⁶⁴ Es existieren mehrere Möglichkeiten, dieses Problem der Konkurrenz von RF1 und Einbau der unnatürlichen Aminosäure zu umgehen oder zumindest einzuschränken. Die Expression von sieben essentiellen Genen über ein Plasmid ermöglicht die Inaktivierung von RF1.¹⁶⁵ Die Mutation von Threonin246 zu Alanin im Abbruchfaktor

RF2 ermöglicht die vollständige Inaktivierung von RF1, sodass die Ausbeuten von mutierten Proteinen mit integrierter unnatürlicher Aminosäure gesteigert werden konnten.¹⁶⁰

Auch die Ersetzung aller 314 endogenen Amber-Stopp-Codons durch das Ochre-Stopp-Codon TAA ermöglicht die Elimination von RF1 und somit zu einer

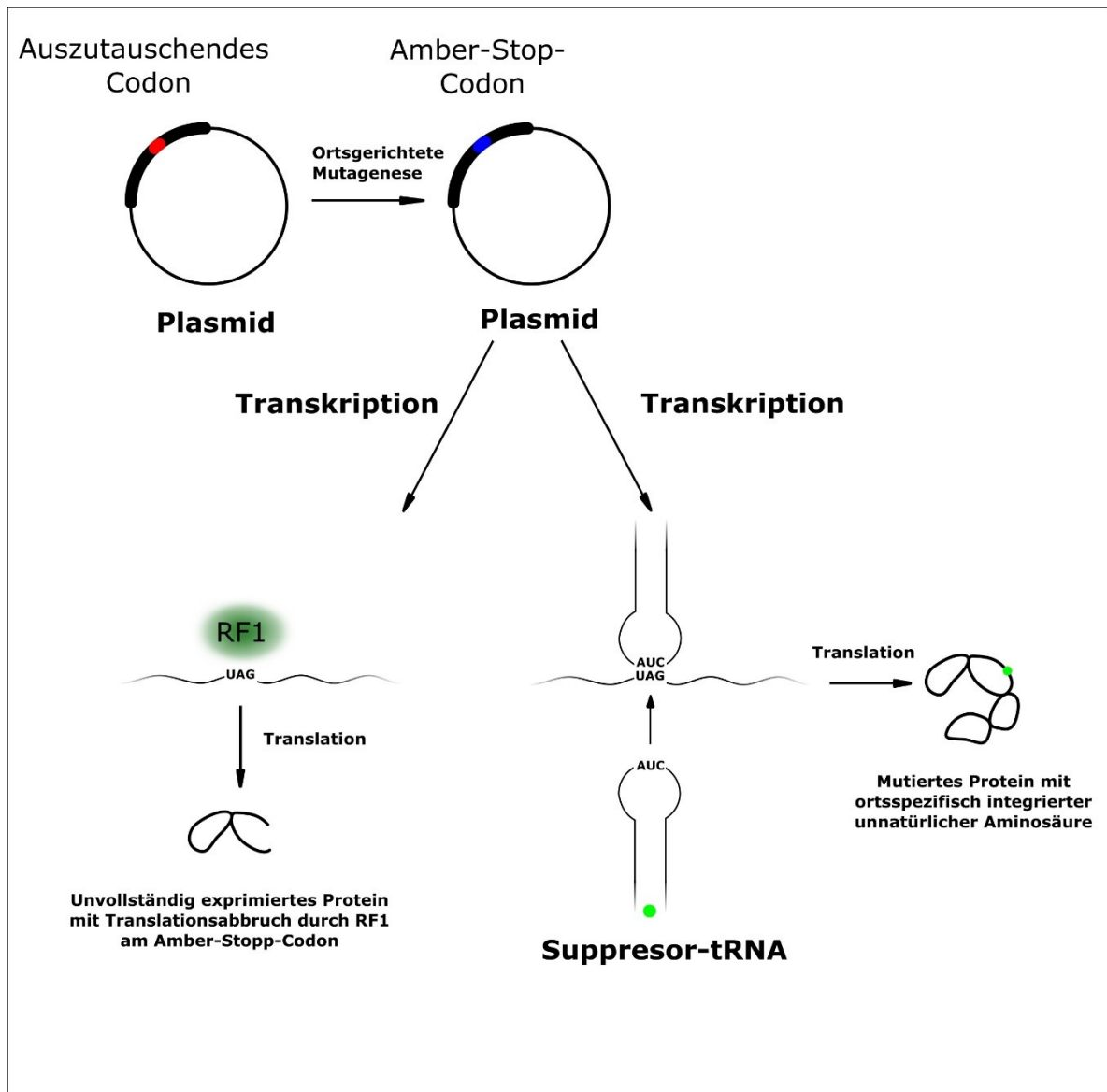


Abb. 1.8-1. Einbau einer unnatürlichen Aminosäure mittels der Amber-Suppressor-Strategie (rechter Teil) und Darstellung des Abbruchs der Translation durch RF1 (linker Teil).

ungehinderten Nutzung des Amber-Stopp-Codons für den Einbau unnatürlicher Aminosäuren.¹⁶⁶ Steigerung der Integrationseffizienz der unnatürlichen Aminosäure ohne Inaktivierung von RF1 oder Mutation der endogenen Amber-Stopp-Codons wurde durch

die Kombination eines konstitutiven glnS^1 -Promoters sowie eines Arabinose-induzierbaren araBAD -Promoters erreicht. Dies ermöglicht die Bereitstellung basaler Mengen an Aminoacyl-tRNA-Synthetase zum Zeitpunkt der Induktion der Expression des Zielproteins mit geringfügigem Einfluss auf die Vitalität der Zellen, während für eine effiziente Integration der unnatürlichen Aminosäure notwendige Mengen an Aminoacyl-tRNA-Synthetase durch Induktion mit Arabinose gesichert werden.¹⁵⁸

Zusätzlich zum System aus *Methanocaldococcus jannaschii* wird auch das *Methanosarcina barkeri*/*Methanosarcina mazei* PylS/PylT -Paar für die Erweiterung des genetischen Codes von *E. coli* genutzt.¹⁶²

Je nach geforderter Anwendung steht eine Vielzahl an unnatürlichen Aminosäuren bereit. Diese ermöglichen die UV-aktivierte Quervernetzung von Proteinen oder Protein-Ligand-Komplexen, den gezielten Einbau acetylierter Lysine zur Untersuchung von Stoffwechselproteinen, die Integration von Phosphoserin zur Untersuchung von phosphorylierungsabhängigen Protein-Protein-Interaktionen, die Bereitstellung von Antikörper-Medikament-Transportsystemen zur Behandlung von Krebszellen, die Steigerung von Enzymaktivitäten, die Schaffung photoinduzierbarer Kinasen durch Deaktivierung der über unnatürliche Aminosäuren gebundenen Inhibitoren, die Etablierung neuartiger, katalytischer Enzymfunktionen, die ortsgerichtete Integration von fluoreszierenden Aminosäuren sowie Kopplung organischer Farbstoffe an die Seitenkette einer unnatürlichen Aminosäure unter bioorthogonalen Bedingungen.^{163,167,168}

Von besonderer Bedeutung für die Einzelmolekülfluoreszenzspektroskopie ist die Integration einer unnatürlichen Aminosäure, deren chemisch einzigartige Seitenkette die ortsspezifische Kopplung eines organischen Farbstoffs unter milden, bioorthogonalen Bedingungen ermöglicht.

Ein Fluorophor, der eine Phosphingruppe trägt, kann in einer bioorthogonalen Staudinger-Bertozzi-Ligation an eine unnatürliche Aminosäure mit einer Azidgruppe in der Seitenkette gebunden werden.^{159,169} Weder Azid- noch Phosphingruppen existieren in natürlichen Biomolekülen, noch reagieren diese Gruppen unspezifisch unter milden Bedingungen mit natürlichen Biomolekülen. Die Staudinger-Bertozzi-Ligation findet ohne Zusatz von Katalysatoren und organischen Lösemitteln statt. Temperaturerhöhung sowie stark

erhöhte oder gesenkte pH-Werte sind für die Reaktion nicht notwendig. ^{159,169}

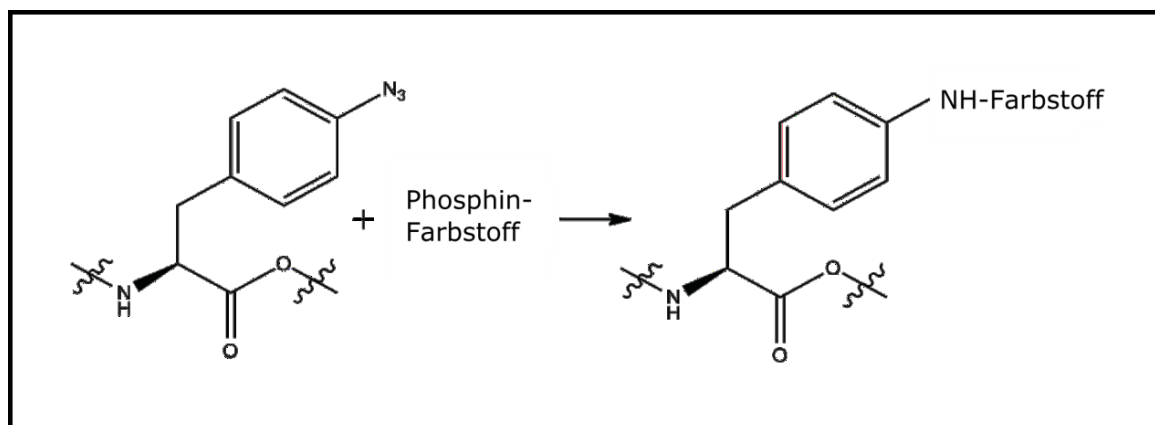


Abb. 1.8-2. Reaktionsgleichung der Staudinger-Bertozzi-Ligation. p-Azido-L-phenylalanine reagiert mit einem Farbstoff, der eine reaktive Phosphingruppe trägt. Die Reaktion ist hochspezifisch, findet im wässrigen Milieu bei Raumtemperatur statt und benötigt keinen Katalysator, sodass die Bioorthogonalität gewährleistet ist.

Zusätzlich zur Staudinger-Bertozzi-Ligation, welche eine Phosphingruppe und eine Azidgruppe benötigt, ist die Kopplung eines Farbstoffs mit terminaler Alkingruppe an eine Aminosäure mit Azidgruppe in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition (*copper-catalysed azide-alkyne cycloaddition*, CuAAC) zu nennen, welche ebenfalls unter milden pH- und Temperaturbedingungen stattfindet, allerdings einen Cu-I-Katalysator benötigt.¹⁷⁰ Die Entfernung des Kupferkatalysators nach der Reaktion sowie die Toxizität des Katalysators für diverse Zelllinien macht diese Methode den katalysatorfreien Techniken allerdings unterlegen.¹⁷¹ Durch Nutzung von gespannten Cyclooctinderivaten kann der Kupferkatalysator eliminiert werden.^{171–173} Weitere Methoden umfassen die Nutzung von Palladium- oder Rutheniumkatalysatoren sowie die UV-aktivierte Tetrazol-Alken-Kopplung.¹⁷¹

Von geringerer Bedeutung für die konformationelle Untersuchung eines einzelnen Enzyms sind fluoreszierende Proteine wie das green fluorescing protein (GFP),¹⁵² da diese aufgrund der Notwendigkeit der Coexpression entweder terminal am Zielprotein lokalisiert sind oder durch die zuvor besprochenen Möglichkeiten gekoppelt werden müssen. Desweiteren sind größenbedingt Wechselwirkungen mit dem Zielprotein zu beachten. Die Helligkeit der fluoreszierenden Proteine ist erheblich niedriger als die der organischen Farbstoffe.^{137,152} In der vorliegenden Arbeit wurden nur organische Fluorophore verwendet.

1.9. Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die biochemische Charakterisierung des Argonaute-Proteins aus *Methanocaldococcus jannaschii* sowie die Etablierung einer Methode zur Aufklärung der strukturell-funktionellen Beziehungen innerhalb des Proteins während der Bindung von einzel- und doppelsträngiger Nukleinsäuren. Im Zentrum standen die Fragen, ob und welche Substrate auf welche Weise prozessiert werden, wie das Protein in die Gruppe der prokaryotischen Argonauten eingegliedert werden kann, welche Funktion MjAgo im Organismus *Methanocaldococcus jannaschii* wahrnimmt, und welche Konformationsänderungen des Proteins bei Bindung seiner Substrate auftreten.

Die dafür etablierten Bindungs- und Aktivitätsstudien zeigten, dass auch Nukleinsäuren stabil gebunden werden, die nicht prozessiert werden. Variationen der Substratkomposition zeigten bisher einmalige Prozessierungsmechanismen und charakterisieren MjAgo damit als einzigartigen Vertreter der Argonaute-Familie mit der Fähigkeit, eine Selbstbeschleunigung des Abbaus invasiver genetischer Elemente durch den Übergang von einem unspezifischen zu einem spezifischen endonukleolytischen Mechanismus durchzuführen. Strukturelle Daten, gewonnen durch Einzelmolekül-Förster-Resonanz-Energie-Transfertechniken und ermöglicht durch ortsgerichtete Integration unnatürlicher Aminosäuren in das Protein mit nachfolgender spezifischer Fluorophormarkierung, belegten nukleinsäureabhängige Konformationswechsel des Proteins. Damit wurde eine Methode etabliert, die die Nachverfolgung der Positionierung der Nukleinsäuren in Relation zu den einzelnen Domänen ermöglicht. Die biochemische Charakterisierung und die dafür etablierten Techniken ermöglichen erstmals fundierte Vermutungen, welche Rolle die Familie der Argonauten in einem Archaeon einnimmt.

2. Material

2.1. Medien

2.1.1. Lysogeny Broth [LB]-Medium

20 g/L Trypton

15 g/L Hefeextrakt

8 g/L NaCl

0,8% (v/v) Glyzerin

Sterilisation durch Autoklavieren

2.1.1. M9-Minimalmedium

0.4% Glukose

2 mM MgCl_2

0,1 M CaCl_2

3 nM $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$

400 nM H_3BO_3

30 nM CoCl_2

10 nM CuSO_4

80 nM MnCl_2

20 nM ZnSO_4

2 mg/mL Thiamin

0,4 mg/mL Cholinchlorid

0,5 mg/mL Folsäure

0,5 mg/mL Nicotinamid

1 mg/mL Myoinositol

1 mg/mL Pyridoxal

0,05 mg/mL Riboflavin

1 mg/mL Biotin

Sterilisation durch Sterilfiltration, Porendurchmesser des Filters 0,45 µm, GE Healthcare Life Sciences

2.1.2. Super Optimal Broth [SOB]-Medium

20 g/L Trypton

5 g/L Hefeextrakt

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

pH 7,5

Steril bezogen von New England BioLabs GmbH

2.1.3. Super Optimal Broth mit katabolischer Repression [SOC]-Medium

20 g/L Trypton

5 g/L Hefeextrakt

10 mM NaCl

2.5 mM KCl

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glukose

pH 7,5

Steril bezogen von New England BioLabs GmbH

2.2. Antibiotika (1000x Stammlösung)

Chloramphenicol

25 mg/mL in Ethanol

Ampicillin

100 mg/mL in Wasser

Sterilisation durch Sterilfiltration, Porendurchmesser des Filters 0,45 µm, GE Healthcare Life Sciences

2.3. Induktionsmittel (1000x Stammlösung)

Sterilisation durch Sterilfiltration, Porendurchmesser des Filters 0,45 µm, GE Healthcare Life Sciences

Arabinose

20% (w/v) in Wasser

Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid

1 M in Wasser

2.4. Puffer für Gelelektrophoresen

Alle Puffer wurden mit einem Filter mit einem Porendurchmesser von 0,45 µm, GE Healthcare Life Sciences, gefiltert.

10x Laemmli-Laufpuffer

240 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethan [Tris], pH 8,3

1,92 M Glycin

35 mM Natriumdodecylsulfat

10x Nativer Laemmli-Laufpuffer

240 mM Tris, pH 8,3

1,92 M Glycin

50x Tris-Acetat-EDTA [TAE]-Puffer

2 M Tris-HCl, pH 8,0

1 M Essigsäure

50 mM Ethylendiamintetraessigsäure [EDTA]

10x Tris-Borat-EDTA [TBE]-Puffer

893 mM Tris-HCl, pH 8,3

890 mM Borsäure

27 mM EDTA

10x Towbin-Transferpuffer

24 mM Tris, pH 8,3

192 mM Glycin

Anodenpuffer für WesternBlot

Towbin-Transferpuffer mit 15% (v/v) Ethanol

Kathodenpuffer für WesternBlot

Towbin-Transferpuffer mit 0.1% (w/v) Natriumdodecylsulfat

TBS-T

50 mM Tris-HCl, pH 7,6

150 mM NaCl

0,05% (w/v) Tween 20

Blockierlösung für WesternBlot

TBS-T

5% (w/v) Casein

2x SDS-PAGE-Ladepuffer nach Laemmli

0,125 M Tris-HCl, pH 6,8

20% (v/v) Glyzerin

4% (w/w) Natriumdodecylsulfat

4% (v/v) 2-Mercaptoethanol

0,02% (w/w) Bromphenolblau

6x DNA Ladepuffer für Agarosegelelektrophorese

10 mM Tris-HCl, pH 7,5

0,03% (w/w) Bromphenolblau

60% Glyzerin

6 mM EDTA

2x RNA-Ladepuffer für denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

95% (v/v) Formamid

0,02% (w/v) Natriumdodecylsulfat

0,02% (w/v) Bromphenolblau

0,01% (w/v) Xylencyanol

1 mM EDTA

2x Ficoll400-Ladepuffer

125 mM Tris-HCl, pH 6,8

5% Ficoll 400

2.5. Färbelösungen

Coomassiefärbelösung

0,1% (w/v) Coomassie-Brilliantblau R

10% (v/v) Essigsäure

40% (v/v) Ethanol

Coomassieentfärbelösung

20% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Essigsäure

2.6. Puffer für FPLC-basierte Chromatographien, Aufschluss, Aktivitäts-, Bindungs- und Einzelmolekülfluoreszenzenergietransferversuche

Natriumchlorid-Glyzerin-Tris-Puffer (NaGT-Puffer)

100 mM NaCl

50 mM Tris-HCl, pH 7,4

10% Glyzerin

1 mM MgCl₂

2.7. Verwendete Oligonukleotide

Folgende, HPLC-gereinigte und von Eurofins-MWG bezogenen Oligonukleotide wurden verwendet:

Tab. 2.7-1. Verwendete Leitstrang-Nukleinsäuren.

Konstruktbezeichnung	Sequenz	Position	Nukleotid-	Farbstoff	Farbstoff-
----------------------	---------	----------	------------	-----------	------------

		des Phosphats	anzahl		position
Leitstrang-RNA	5'-P-UGAGGUAGUAGGUUGUATAGU	5'-Ende	21	---	---
T-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	---	---
G-Leitstrang	5'-P-GGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	---	---
C-Leitstrang	5'-P-CGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	---	---
A-Leitstrang	5'-P-AGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	---	---
GC-Leitstrang	5'-P-GCAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	---	---
GA-Leitstrang	5'-P-GAAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	---	---
GT-Leitstrang	5'-P-GTAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	---	---
13 nt-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGT	5'-Ende	13	---	---
15 nt-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTG	5'-Ende	15	---	---
17 nt-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTA	5'-Ende	17	---	---
19 nt-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTATA	5'-Ende	19	---	---
23 nt-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTATACTAG	5'-Ende	23	---	---
41 nt-Leitstrang	5'- ACGGACATTACGAGGTAGTAGGTTGTATAGTCTTATCACCT	5'-Ende	41	---	---
Leitstrang -P	5'-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	---	21	---	---
3'AF-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	Atto550	3'-Ende
p13AT-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	Atto550	13
p14AT-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	Atto550	14
p18AT-Leitstrang	5'-P-TGAGGTAGTAGGTTGTATAGT	5'-Ende	21	Atto550	18
p18AT-RNA	5'-P-UGAGGUAGUAGGUUGUATAGU	5'-Ende	21	Atto550	18
as2B T-Leitstrang	5'-P-TAGAGGTACGTGCTGAGGCTT	5'-Ende	21	---	---
as2B G-Leitstrang	5'-P-GAGAGGTACGTGCTGAGGCTT	5'-Ende	21	---	---
as2B T-Leitstrang -P	5'-TAGAGGTACGTGCTGAGGCTT	---	21	---	---
as2B G-Leitstrang -P	5'-GAGAGGTACGTGCTGAGGCTT	---	21	---	---
siLuc T-Leitstrang	5'-P-TATTCTATCCGCTGGAAGATG	5'-Ende	21	---	---
siLuc G-Leitstrang	5'-P-GATTCTATCCGCTGGAAGATG	5'-Ende	21	---	---
T7-Leitstrang vorwärts	5'-P-CCCTATAGTGAGTCGTATTA	5'-Ende	20	---	---
T7-Leitstrang rückwärts	5'-P-CTCACAATCCCCCATAGTG	5'-Ende	20	---	---

Tab. 2.7-2. Verwendete Zielstrang-Nukleinsäuren.

Konstruktbezeichnung	Sequenz	Position des Phosphats	Nukleotid- anzahl	Farbstoff	Farbstoff- position
Zielstrang-RNA	5'-P- UAUACAACCUACUACCUCGU	---	20	---	---
Zielstrang-RNA p17- TAMRA	5'-UAUACAACCUACUACCTCGU	---	20	TAMRA	17
Let7-Zielstrang	5'-TATACAACCTACTACCTCGT	---	20	---	---
p17-AF-Zielstrang	5'-TATACAACCTACTACCTCGT	---	20	Alexa647	17
Zielstrang-3'P	5'-P-TATACAACCTACTACCTCGT	3'-Ende	20	Alexa647	17
p17-AF-5'P	5'-P-TATACAACCTACTACCTCGT	5'-Ende	20	Alexa647	17
p3-AF-Zielstrang	5'-P- TATACAACCTACTACCTCGT	---	20	Alexa647	3
41 nt-5'AF-Zielstrang	5'- AGGTGATAAGACTATACAACCTACTACCTCGTAATGTCCGT	---	41	Alexa647	5'-Ende

41 nt-p37-Zielstrang	5'- AGGTGATAAGACTATACAACCTACTACCTCGTAATGTCCGT	---	41	Alexa647	37
Zielstrang-17f	5'-TATACAACTCACTACCTCGT	---	20	Alexa647	17
as2b p18-AF-Zielstrang	5'-GCCTCAGCACGTACCTCTATT	---	21	Alexa647	18
as2b p4-AF-Zielstrang	5'-GCCTCAGCACGTACCTCTATT	---	21	Alexa647	4
as2b Zielstrang-5'-P	5'-P-GCCTCAGCACGTACCTCTATT	5'-Ende	21	Alexa647	18
as2b Zielstrang-3'-P	5'-GCCTCAGCACGTACCTCTATT-P	3'-Ende	21	Alexa647	18
siLuc Zielstrang	5'-TCTTCCAGCGGATAGAATTA	---	20	Alexa647	18
siLuc Zielstrang-3'P	5'-TCTTCCAGCGGATAGAATTA-P	3'-Ende	20	Alexa647	18

2.8. Verwendete Plasmide

Alle Plasmide wurden gemäß Punkt 3.2.1 aus *E. coli* gewonnen.

Tab. 2.8-1. Verwendete Plasmide.

Konstruktbezeichnung	Vektor	Vektorhersteller	Insert / ggf. Mutation	Anmerkungen	Resistenz
WT Expression N-term	pET101	Invitrogen	MjAgo	C-terminaler 6xHis-Tag	Ampicillin
WT Expression C-term	pET151/D	Invitrogen	MjAgo	N-terminaler 6xHis-Tag	Ampicillin
N76AzF	pET101	Invitrogen	MjAgo/226A>T 228C>G	C-terminaler 6xHis-Tag	Ampicillin
S221AzF	pET101	Invitrogen	MjAgo/662C>A 663T>G	C-terminaler 6xHis-Tag	Ampicillin
I410AzF	pET101	Invitrogen	MjAgo/1230A>T 1231T>A 1232T>G	C-terminaler 6xHis-Tag	Ampicillin
E541A	pET101	Invitrogen	MjAgo/541E>A	C-terminaler 6xHis-Tag	Ampicillin
pGEX-2TK	pGEX-2TK	F. Werner ¹⁷⁴	MjSpt4/5		Ampicillin
pEvol mit Mj-aaRS/suppressor tRNA	pEvol			Nach Young, 2010	Chloramphenicol



Abb. 2.8-1. Übersicht über die verwendeten Vektoren.

2.9. Genutzte *E. coli*-stämmе

DH5α

BL21/DE3

2.10. Größenstandards für Gelelektrophoresen

Generuler 1 kb DNA Ladder, ThermoFisher Scientific und PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Scientific

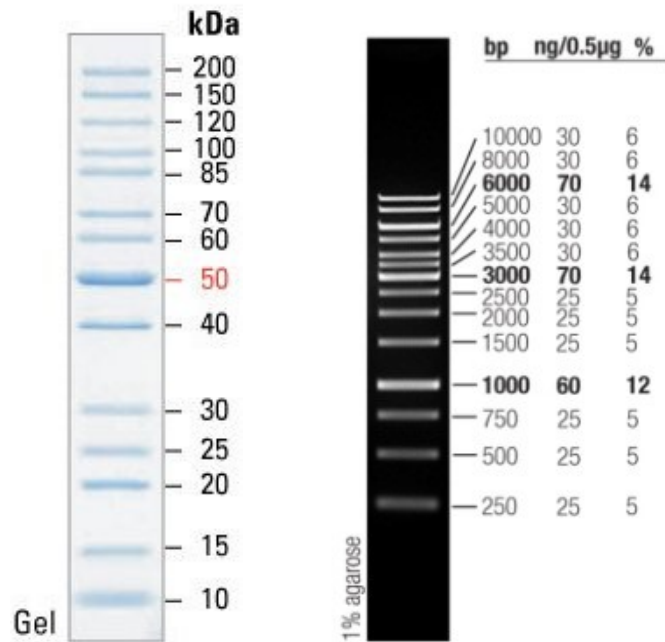


Abb. 2.10-1. Verwendete Marker. PageRuler Unstained Protein Ladder (links) und Generuler 1 kb DNA Ladder (rechts).

2.10. *Methanocaldococcus jannaschii* Argonaute

GeneID: DSM2661

Berechnete molare Masse: 84,5 kDa

Anzahl Aminosäuren: 713

Extinktionskoeffizient: 122510 M⁻¹cm⁻¹

2.11. Geräteliste

Zentrifugen

Eppendorf, Zentrifuge 5424 R

Eppendorf, Zentrifuge 5418 R

Eppendorf, Zentrifuge 5810R

Beckman Coulter, Avanti J-E

Ultraschallsonde

Bandelin, HD 2070

Spektrometer

WPA biowave, CO80000 Cell Density Meter

Cary Eclipse, Fluoreszenz-Spektrophotometer

ThermoScientific, Nanodrop

PeqLab, ND-1000

Beckman, DU 640

Sterilbank

Heraeus, HLB 2448

Stromzufuhr für Elektrophoresen

Bio-Rad, PowerPac Basic

Bio-Rad, PowerPac HV High-Voltage Power Supply

Thermocycler

Eppendorf, Mastercycler gradient

MJ Research, PTC-225 Peltier Thermal Cycler

Eppendorf, ThermoMixer C

Waage

Sartorius, Acculab

Sartorius, CP2202 S

Schüttler

Labnet, Rocker 25

Infors, Multitron Pro

UV-Transilluminator

UVP BioDoc-It Imaging System

FPLC

GE Healthcare, Äkta Basic
GE Healthcare, Äkta Explorer
GE Healthcare, Äkta Purifier

3. Methoden

Sofern nicht anders vermerkt, wurden alle Schritte bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1. Klonierung und Lagerung von *E. coli*

3.1.1. Ortsgerichtete Mutagenese des MjAgo-Gens

Zur strukturell-funktionellen Untersuchung durch FRET von MjAgo unter verschiedenen Bedingungen sollte das Protein ortsgerichtet mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Die Möglichkeit, dies über eine Kopplung des Farbstoffs an die Sulfhydrylgruppe der Cysteine durchzuführen,^{154,155} schloss sich aus, da auf Grund des Vorhandenseins von 6 Cysteinen in MjAgo eine eindeutige, ortsgerichtete Farbstoffinkorporation nicht durchführbar war.

Infolge dessen wurde die Amber-Suppressor-Strategie angewendet. Dazu wird eine Aminosäure des Proteins durch die gewünschte unnatürliche Aminosäure ersetzt. Das Codon, welches für die ursprüngliche Aminosäure codiert, wird zum Amber-Stopp-Codon TAG mutiert. Dieses Codon codiert in *E. coli* nicht für eine natürliche Aminosäure und würde normalerweise zur Termination der Translation führen. Zur Unterdrückung dieses Vorgangs wurde ein Paar aus mutierter Aminoacyl-tRNA-Synthetase und Suppressor-tRNA [aaRS/tRNA] aus *Methanocaldococcus jannaschii* in den *E. coli*-Expressionsstamm mittels des pEvolv-pAzF-Plasmids eingebracht. Dadurch werden ausschließlich die gewünschten tRNAs durch die orthogonalen aaRS aminoacyliert und demnach nur in Reaktion auf das amber-Codon die unnatürliche Aminosäure inkorporiert.^{156–158,175}

Das Amber-Stopp-Codon TAG wurde durch ortsgerichtete Mutagenese mittels des QuikChange II site-directed mutagenesis kit (Agilent) nach Herstellerangaben mit Verwendung der Polymerase PfuUltra eingebracht. Bei dieser Methode wird eine Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) des gesamten Plasmids durchgeführt. Die dafür verwendeten Primer enthalten die gewünschte Mutation, die daraus entstehenden Amplifikate können auf Grund des Fehlens einer Methylierung durch Inkubation mit einer methylierungssensitiven DNase von den Ampliconen, sofern diese eine entsprechende Methylierung aufweisen, getrennt werden. Zusätzlich kann die *splice-by-overlap*-Methode angewendet werden. Bei dieser Methode werden Abschnitte des zu mutierenden Gens anstatt eines vollständigen Gens mit Primern amplifiziert, die die

gewünschte Sequenz enthalten, und anschließend das mutierte Gen in einen Vektor ligiert. Das mutierte Gen wurde anschließend in den pET101/D-TOPO-Vektor mit C-terminalem 6xHistidin-Tag kloniert. Dieser weist ein IPTG-induzierbares Lactose-Operon auf. Daraufhin konnte das mutierte Protein in *E. coli* BL21/DE3 exprimiert werden.^{158,175} Die Verifikation der erfolgreichen Mutation erfolgte durch Sequenzierung des relevanten Plasmidabschnitts durch die Firma Eurofins MWG.

Die Mutanten N76AzF und I410AzF wurden aus vorhergehenden Arbeiten erhalten.

Die Doppelmutante S221/I410AzF sowie S221AzF wurden von Prof. Dr. Dina Grohmann hergestellt

3.1.2. Transformation von Plasmiden in *E. coli*

50 µL einer Kultur chemisch-kompetenter, bei -80°C gelagerter *E. Coli*-Zellen wurden auf Eis für 30 Minuten aufgetaut, mit 500 ng Plasmid versetzt und für weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden mit nachfolgender Inkubation auf Eis für zwei Minuten. Nach Zugabe von 500 µL SOC-Medium wurden die Zellen bei 37°C für eine Stunde kultiviert und anschließend auf eine LB-Agar-Kulturplatte ausgebracht, um über Nacht bei 37°C die Bildung einer sichtbaren Kolonie zu ermöglichen. Die in der Platte enthaltenen Antibiotika gewährten den für die Selektion notwendigen evolutionären Druck und ermöglichten die Isolierung transformierter *E. coli*.

3.1.3. Erstellung von Glyzerinkulturen zur Dauerlagerung

Zur Dauerlagerung wurden Kulturen in LB-Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker bis zu einer optischen Dichte von 1.0 kultiviert, mit sterilem Glycerin auf eine Glycerinkonzentration von 40% eingestellt, in flüssigem Stickstoff schockgefrostet und bei -80°C gelagert.

3.2. Gewinnung und Konzentrationsbestimmung von DNA

3.2.1. Extraktion von Plasmiden aus *E. coli*

5 mL bzw. 100 mL LB mit dem entsprechenden Selektionsmarker wurden mit einer Einzelkolonie mit dem entsprechend transformierten *E. coli* DH5α angeimpft und über Nacht bei 37°C unter schütteln bei 120 rpm kultiviert. Die Aufreinigung des Plasmids erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Mini- bzw. Midiprep Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben.

3.2.2. Extraktion genomischer DNA aus *Methanocaldococcus jannaschii*

Die Extraktion genomischer DNA wurde mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aus 2 g *Methanocaldococcus jannaschii*-Zellmasse durchgeführt.

3.2.3. Genomische DNA aus *Sulfolobus acidocaldarius* und *Pyrococcus furiosus*

Genomische DNA von *S. acidocaldarius* wurde von der Arbeitsgruppe von Sonja Albers, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, zur Verfügung gestellt.

Genomische DNA von *P. furiosus* wurde von der Arbeitsgruppe von Winfried Hauser, Universität Regensburg, zur Verfügung gestellt.

3.2.4. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

Die Konzentration von Nukleinsäuren und Proteinen wurde mittels Nanodrop-Verfahren durch Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (Proteine) bzw. 260 nm (Nukleinsäuren) nach Betriebsanleitung des Geräteherstellers bestimmt.

3.2.5. DNA-Fällung

Zur Reinigung und Konzentrationserhöhung von DNA-Proben wurden Natriumacetatfällungen durchgeführt. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 10% (V/V) an 3 M Natriumacetatlösung und dem zweifachen Volumen an 70% Ethanollösung versetzt, bei -80°C für eine Stunde inkubiert und anschließend für eine Stunde bei 4°C mit 20.000 x g zentrifugiert und damit pelletiert. Der Überstand wurde sodann verworfen und das doppelte ursprüngliche Probenvolumen an 70% Ethanollösung zu der ausgefallenen DNA gegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 20.000 x g für 45 Minuten bei 4°C wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei 37°C getrocknet. Anschließend erfolgte die Rücklösung in Wasser in einem geeigneten Volumen.

3.3. Expression

Alle Expressionen fanden in *E. coli* BL21/DE3 statt.

3.3.1. Wildtypprotein und MjAgo^{E541A}

Zur Expression des MjAgo-Wildtyps sowie der katalytischen Mutante MjAgo^{E541A} mit wurde mit Ampicillin (Endkonzentration 100 mg/L) versetztes LB-Medium mit einer Glycerinkultur von *E. coli* BL21/DE3, die das entsprechende Expressionsplasmid enthalten, angeimpft und bei 37°C über Nacht unter schütteln bei 120 rpm kultiviert. Die Expressionskultur in LB-Medium mit Ampicillin wurde mit der Vorkultur auf eine optische Dichte von 0,1 angeimpft und bei 37°C unter schütteln kultiviert. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 1,2 wurde die Expression mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert und die Kultur für 12 Stunden bei 37°C unter schütteln inkubiert.

3.3.2. MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure

Die Expression der mutierten MjAgo-Varianten beinhaltete die Integration der unnatürlichen Aminosäure p-Azido-L-phenylalanin. Dazu wurde eine Übernachtskultur aus 10 mL LB-Medium, versetzt mit Ampicillin (Selektionsmarker des MjAgo-Expressionsplasmids, Endkonzentration 100 mg/L) und Chloramphenicol (Selektionsmarker des Mj-Aminoacyl-tRNA-Synthetase/Suppressor tRNA-Paar-Expressionsplasmids pEVOL^{AzF}, Endkonzentration 25 mg/L), bei 37°C unter Schütteln bei 120 rpm inkubiert. Diese Kultur wurde am nächsten Tag bei 6000 x g pelletiert und in 100 mL M9-Minimalmedium, versetzt mit Ampicillin und Chloramphenicol in der zuvor verwendeten Konzentration, überführt. Dabei wurde eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Nach Kultivierung über Nacht bei 37°C unter Schütteln wurden 0,5 Liter einer frischen M9-Minimalmediumkultur mit Ampicillin und Chloramphenicol, mit den zuvor beschriebenen Endkonzentrationen, als Expressionskultur angelegt und mit der vorhergehenden Übernachtskultur auf eine optische Dichte von 0,1 eingestellt. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C unter schütteln bei 120 rpm. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 1,2 erfolgte die Induktion mit 1 mM IPTG und 0,02% Arabinose unter Zugabe von 50 mg/L p-Azido-L-phenylalanin, die Expression wurde bei 37°C unter schütteln bei 120 rpm für 12 Stunden durchgeführt. (nach ¹⁷⁶)

3.4. Extraktion und Purifikation von MjAgo

3.4.1. Zellaufschluss und Hitzedenaturierung der *E. coli*-Proteine

Expressionskulturen wurden bei 6000 x g für 20 min pelletiert und anschließend in NaGT-Puffer, versetzt mit 20 mM Imidazol, resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels einer Ultraschallsonde bei einer Ausgangsleistung von 50 W in zwei Schritten für insgesamt 15 Minuten mit anschließender Zentrifugation bei 10000 x g für 45 Minuten. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und zum Zwecke der Hitzedenaturierung der *E. coli*-proteine bei 85°C (Wildtyp) beziehungsweise 75°C (MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure und katalytisch inaktive Mutante MjAgo^{E541A}) für 45 min (Wildtyp) beziehungsweise 30 min (Mutanten) inkubiert. Der Überstand mit gelöstem MjAgo, welches auf Grund seiner Herkunft aus einem thermophilen Organismus eine hohe Temperaturstabilität aufweist, wurde nach erneuter Phasentrennung bei 15000 x g für 45 Minuten abgenommen. Die endgültige Reinigung des MjAgo-Proteins erfolgte mittels Immobilisierter-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).

3.4.2. Chromatographische Reinigung von MjAgo mittels IMAC

Das im zuvor hitzeinkubierten Zellextrakt befindliche Argonaute wurde mittels des 6xHistidin-Tags durch Chelatisierung der an der Säulenmatrix befindlichen Ni²⁺-Ionen immobilisiert. Anschließend fand die Entfernung unspezifisch gebundener Proteine durch Spülen der Säule mit NaGT-Puffer, versetzt mit 20 mM Imidazol, für 20 Säulenvolumina statt. Die daraufhin erfolgte Stoßelution mit NaGT-Puffer, versetzt mit 250 mM Imidazol, ergab eine hochreine, konzentrierte Argonaute-Proteinlösung. Die Proteindetektion während des gesamten Vorgangs fand über UV-Absorption bei 280 nm statt. Es wurde die Säule HisTRap HP von GE Healthcare LifeSciences (1 mL, Nickel-Sepharosematrix) verwendet.

3.4.3. Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographien nutzen die Unfähigkeit großer Proteine, enge Poren in der Säulenmatrix zu passieren, aus. Dadurch erfolgt eine Auftrennung einer heterogenen Lösung nach der Größe der Moleküle. Dabei passieren kleine Moleküle enge Öffnungen innerhalb der Gelmatrix und werden dadurch in ihrer Migration im Verhältnis zur Lauffront ausgebremst, während diese Verlangsamung bei Molekülen, die größenbedingt weniger Öffnungen passieren können, im geringeren Maße auftritt. Große Moleküle passieren somit die Säule schneller als kleine Moleküle.

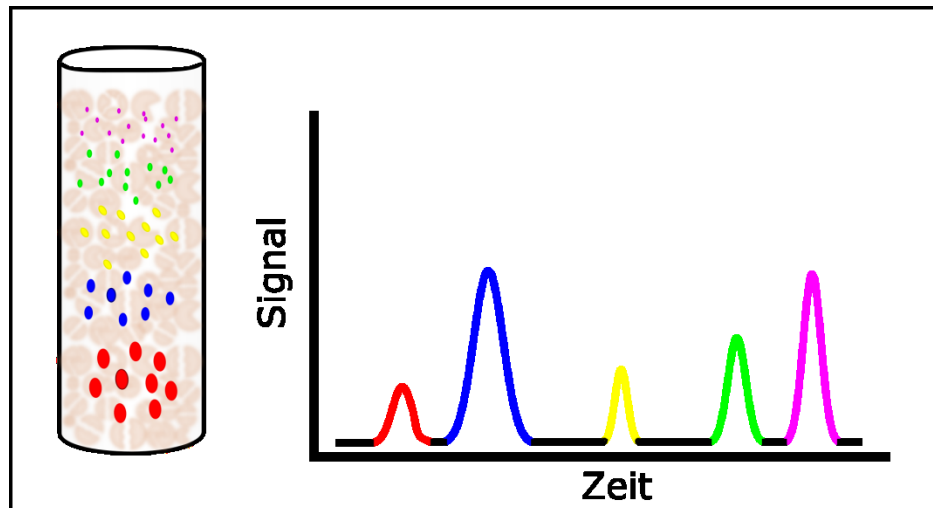


Abb. 3.4.3-1. Schematische Darstellung der Größenausschlusschromatographie mit Elutionsprofil.

In dieser Arbeit wurden alle Größenausschlusschromatographien mit der Superose 6 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences) mit einer Säulenmatrix aus quervernetzter Agarose durchgeführt. Als Laufpuffer diente der NaGT-Puffer, frisch versetzt mit 10 mM DTT, bei einer Flussgeschwindigkeit von 0.5 mL/min. Auch hier fand die Detektion der Proteine über UV-Absorption bei 280 nm statt. Mit dieser Technik konnten überschüssige, ungebundene Farbstoffe, ungebundene DNA sowie nicht-komplexierte Proteine von DNA-Protein-Komplexen für die Verwendung in Einzelmolekülmessungen getrennt werden. Die Elutionsfraktionen wurden dabei in 0,5 mL-Fractionen aufgefangen.

3.5. Techniken für Aktivitäts- und Bindungsstudien von MjAgo

3.5.1. Native und denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese [PAGE]

Polyacrylamidgelelektrophorese nutzt eine Gelmatrix zur Behinderung der Migration von Makromolekülen unter Beschleunigung durch ein elektrisches Feld. Die Beschleunigung der jeweiligen Proteinspezies hängt im nativen Falle von der Länge der Aminosäureketten, der Struktur des Proteins bzw. des Komplexes sowie von der durch den pH-Wert bestimmten Eigenladung ab. Die Proteine sind in der denaturierenden Variante durch Natriumdodecylsulfat linearisiert und weisen eine ihrer Länge proportionale Ladung auf, sodass die Migration der Proteine direkt abhängig von ihrer Primärstruktur ist und sekundäre, tertiäre sowie quartäre Strukturen keine Relevanz mehr aufweisen. Mittels der denaturierenden PAGE konnte eine Identifikation der Proteine durch ihr anhand des Markers bestimmtes Molekulargewicht durchgeführt werden. Desweiteren wurde die

Reinheit der Proteinlösung bestimmbar. Native PAGE wurde für Gelverzögerungsexperimente genutzt.

Für die denaturierende PAGE wurden die jeweiligen Proteinlösungen mit SDS-PAGE-Ladepuffer versetzt, für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend auf das Gel geladen. Im Falle der nativen PAGE wurden die Proben mit Ficoll400-Ladepuffer versetzt und ohne weitere Behandlung direkt auf das Gel geladen. Die beladenen Gele liefen für 50 Minuten bei 200 V. Visualisierung der nativen Gele erfolgte über Fluoreszenzdetektion der markierten Spezies innerhalb der Probe. Die denaturierenden Gele wurden für eine Stunde mit Coomassiefärbelösung unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend für mindestens eine Stunde unter leichtem Schütteln mit Coomassieentfärbelösung von überschüssigem Farbstoff befreit.

Denaturierende Polyacrylamidgele wurden mit folgender Zusammensetzung angefertigt:

12% Trenngel in Wasser:

- 12% (w/v) Bis-Acrylamid/Acrylamid (Verhältnis 37,5:1, Rotiphorese 40, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- 400 mM Tris-HCl, pH 8,8
- 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat

5% Sammelgel in Wasser:

- 5% (w/v) Bis-Acrylamid/Acrylamid (Verhältnis 37,5:1, Rotiphorese 40, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- 12,75 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat

Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 1% Ammoniumpersulfat und 0,1 % Tetramethylethyldiamin gestartet.

Native Polyacrylamidgele wurden mit der gleichen Zusammensetzung wie denaturierende Gele angefertigt, allerdings ohne Zusatz von Natriumdodecylsulfat.

3.5.2. Native und denaturierende Agarosegelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von DNA-Fragmenten im Auflösungsbereich größer als 100 Basenpaare wurde die Agarosegelelektrophorese eingesetzt. Dies betrifft im besonderen PCR-Produkte, Plasmide und Fragmente genomischer DNA, auch deren Abbauprodukte nach Inkubation mit MjAgo.

0.5 - 1% (v/v) Agarose in TAE-Puffer wurden aufgeköcht und anschließend bis kurz vor Erstarren abgekühlt. Zur späteren Visualisierung der geladenen DNA wurde direkt vor dem Guss Sybr Safe (Thermo Fisher Scientific, 1 µL/20 mL Agarosegel) hinzugegeben. Native Proben wurden mit 1 µL FastDigest Green Buffer (Thermo Fisher Scientific) versetzt und geladen. Das Gel lief sodann für 45 Minuten bei 80 V.

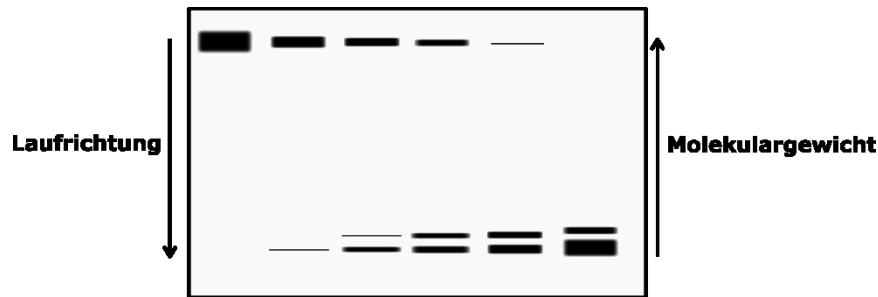


Abb. 3.5.2-1. Schematische Darstellung einer Gelelektrophorese. In diesem Schema wird davon ausgegangen, dass die Moleküle eine Ladung proportional zu ihrem Molekulargewicht aufweisen.

Denaturierende Gele wurden analog zu den nativen Gelen angefertigt, enthielten als Denaturierungsreagenz zusätzlich 1 M Harnstoff sowohl in der Gellösung als auch im Laufpuffer. Die Proben hierfür wurden auf eine Harnstoffkonzentration von 3 M eingestellt und ebenfalls mit 1 µL FastDigest Green Buffer geladen. Auch diese Gele liefen für 45 Minuten bei 80 V.

3.5.3. Denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese mit Sequenziergelen

Zur nukleotidgenauen Auftrennung von DNA- und/oder RNA-Oligonukleotiden wurde denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt. Um eine nukleotidgenaue Auftrennung erreichen zu können, wird eine Sequenziergelapparatur (Sequi-Gen GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell, BioRad) mit einer Trennstrecke des Gels von 50 cm sowie einer durch Verwendung von intensiver quervernetzender Bis-Acrylamid/Acrylamid-

Lösung stärker separierenden Gelmatrix genutzt. Zusätzlich findet eine Denaturierung der Probe, bestehend aus Nukleinsäuren und Protein, durch Formamid, Harnstoff und eine erhöhte Temperatur statt, um Wechselwirkungen der Probenkomponenten untereinander und damit eine Veränderung des Laufverhaltens zu vermeiden.

Mittels dieser Methode konnten die Reaktionsprodukte einer Prozessierung von Nukleinsäuren durch MjAgo untersucht werden. Die Auftragung der zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Reaktion entnommenen Proben ließ Rückschlüsse über den Einfluss der Substrateigenschaften sowie der Reaktionsbedingungen auf die Prozessierung durch MjAgo zu. Speziell Größe und Anzahl der entstehenden Produkte waren von besonderem Interesse.

Denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgele, im folgenden Sequenziergele, wurden mit folgender Zusammensetzung angefertigt:

- 15% (w/v) Bis-Acrylamid/Acrylamid (Verhältnis 19:1, Rotiphorese 40, Carl Roth GmbH & Co. KG)
- 89 mM Borsäure
- 89,3 mM Tris, pH 8,3
- 2,7 mM EDTA
- 6 M Harnstoff

Das Gel wurde auf 30°C erhitzt und anschließend beladen. Die zu ladenden Proben wurden zuvor mit RNA-Ladepuffer versetzt und auf 95°C für 5 Minuten erhitzt. Anschließend wurde die Trennung bei einer Maximalleistung von 70 W für 80 Minuten vollzogen. Dabei wurde das Gel auf 40°C erhitzt. Die Visualisierung erfolgte durch Fluoreszenzdetektion (FLA-Scanner 7000, GE Healthcare) der markierten Spezies.

3.5.4. Aktivitätsassays von MjAgo mit Visualisierung durch Sequenziergel

Die Fähigkeit MjAgos, doppelsträngige Nukleinsäuren zu prozessieren, sollte durch einen Aktivitätsassay untersucht werden. Hierbei waren insbesondere die Größe der einzelnen Schnittprodukte sowie die Geschwindigkeit dieses Vorgangs in Abhängigkeit des Vorhandenseins und der Position eines Phosphats an einem oder beiden Strängen von Interesse. Desweiteren sollte der Einfluss der Nukleinsäuresequenz auf die nukleolytische Aktivität analysiert werden. Dazu wurde ein Aktivitätsassay etabliert, in welchem die Prozessierung von doppelsträngiger DNA und RNA sowie Hybride dieser durch MjAgo

untersucht wurden. Durch Probennahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnten desweiteren Geschwindigkeitsunterschiede in Abhängigkeit von der verwendeten DNA beobachtet werden. Zur Visualisierung der Spaltprodukte wurde denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese mit Sequenziergelen verwendet. In Tabelle 3.15-1 findet sich die typische Zusammensetzung eines solchen Aktivitätsassays. Es wurde standardmäßig ein Volumen von 15 μL verwendet.

Tab. 3.5.4-1. Zusammensetzung eines Aktivitätsassays; die Reaktion findet in NaGT-Puffer statt.

BSA	4,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
DTT	10 mM
Leitstrang	333 nM
Zielstrang	666 nM
Ago	3 μM

Die Komponenten wurden zusammen auf 85°C erhitzt, wodurch die Reaktion gestartet wurde. Die Reaktion wurde durch Zugabe von RNA-Ladepuffer mit anschließender Erhitzung auf 95°C für 5 Minuten und damit einhergehender Denaturierung von Protein und Nukleinsäuren durch das im Ladepuffer befindliche Formamid nach 7,5 und 15 Minuten beendet. Zusätzlich wurde eine Probe vor Reaktionsbeginn genommen.

Dabei wurden Leitstränge einer Länge von 13 bis 41 Nukleotiden verwendet, Zielstränge einer Länge von 20 bis 41 Nukleotiden. Mit dieser Technik konnte der Einfluss der Länge, der Struktur, der Sequenz sowie der DNA-Modifikationen untersucht werden.

3.5.5. Aktivitätsassays von MjAgo mit Visualisierung durch Agarosegelelektrophorese

Zur Untersuchung, ob und unter welchen Bedingungen MjAgo langkettige, doppelsträngige DNA-Konstrukte wie Plasmide und genomische DNA prozessieren kann, wurden entsprechende Aktivitätsassays mit anschließender Auftrennung und Visualisierung durch Agarosegelelektrophorese etabliert. Da auch nach der Prozessierung weiterhin eine Bindung von MjAgo mit den Nukleinsäuren auftreten kann, wurde 1 M Harnstoff als

Denaturierungsreagenz sowohl im Gel als auch im Laufpuffer verwendet. Die Aktivität MjAgos bei Nutzung dieser Konstrukte konnte im Temperaturbereich von 37°C bis 85°C beobachtet werden. Die Reaktion wurde durch Einstellen einer Harnstoffkonzentration von 3 M mit anschließender Erhitzung auf 85°C für 5 Minuten beendet. Eine typische Zusammensetzung eines solchen Aktivitätsassays bei 85°C ist in Tabelle 3.16-1 gezeigt, die Zusammensetzung für die Prozessierung von genomischer DNA entspricht der Zusammensetzung für die Prozessierung von plasmidaler DNA, allerdings mit 14 ng/μL genomischer DNA. Der Versuch umfasste ein Reaktionsvolumen von 10 μL. Es wurden nach 15, 30, 60 und 120 Minuten Proben entnommen, sowie eine zusätzliche Probe vor Beginn der Inkubation.

Tab. 3.5.5-1. Zusammensetzung des Aktivitätsassays zur Untersuchung der Prozessierung eines Plasmids durch MjAgo; die Reaktion findet in NaGT-Puffer statt.

Plasmid	40 ng/μL
Ago	3 μM

Zunächst wurde Plasmid-DNA nach der zuvor genannten Methode für diese Assays genutzt. Zur genaueren Charakterisierung der Prozessierung langkettiger DNA durch MjAgo wurde der Einfluss folgender Faktoren untersucht:

Einsatz von Leitsträngen: Es wurden DNA-Oligonukleotide (T7-Leitstrang vorwärts, T7-Leitstrang rückwärts, je 2 μM) zur Reaktion hinzugegeben, welche je einen Leitstranggeführten Schnitt pro Plasmidstrang durch MjAgo ermöglichen. Desweiteren wurde der Einfluss von DNA-Oligonukleotiden (T-Leitstrang, as2B-Leitstrang, je 2 μM) auf die Reaktion MjAgos mit einem Plasmid untersucht, welche nicht als Leitstrang genutzt werden können. Mit diesem Vorgehen sollte untersucht werden, ob eine initiale Öffnung der ringförmigen Struktur der Plasmid-DNA einen signifikanten Einfluss auf die Geschwindigkeit der Degradation durch MjAgo hat.

Es konnte beobachtet werden, dass die Prozessierung von Plasmid-DNA und genomischer DNA zu einer Akkumulation kurzkettiger Degradationsprodukte führt. Durch Zugabe dieser Produkte zu der Prozessierungsreaktion von Plasmid-DNA (pGEX-2TK) durch MjAgo sollte die potentielle Nutzung der Produkte als Leitstrang untersucht werden. Die zur Reaktion

hinzugefügten Produkte wurden durch die zuvor beschriebene Methode bei 85°C für 2 Stunden durch Prozessierung von 100 ng entweder des Plasmids pGEX-2TK oder pMA mit MjAgo erzeugt. Es sollte dabei untersucht werden, ob die Degradationsprodukte eines Plasmids die Degradation eines anderen Plasmids beschleunigen können, oder ob eine potentielle Beschleunigung nur bei Verwendung von Degradationsprodukten des gleichen Plasmids auftritt.

Einsatz von genomischer DNA: Es wurde die genomische DNA der Organismen *Pyrococcus furiosus*, *Sulfolobus acidocaldarius* und *Methanocaldococcus jannaschii* für die Prozessierung durch MjAgo eingesetzt. Damit sollte geklärt werden, ob Modifikationen der DNA eine Degradation durch MjAgo verhindern.

3.5.6. Gelverzögerungsexperimente

Zur Untersuchung der Fähigkeit MjAgos zur Bindung von verschiedenen Nukleinsäurekonstrukten wurden Gelverzögerungsexperimente (*Electro Mobility Shift Assays*, EMSA) durchgeführt. Dabei wird die Änderung der Mobilität des von Nukleinsäuren freien MjAgos bei Bindung von Nukleinsäuren ausgenutzt, um ein unterschiedliches Laufverhalten während einer nativen Polyacrylamidgelelektrophorese zu erzeugen. Dadurch passieren innerhalb einer bestimmten Zeit die unterschiedlichen Komplexe eine unterschiedliche Laufstrecke im Gel. Komplexe, bestehend aus MjAgo und Nukleinsäure, migrieren dabei entsprechend der höheren Molekülgröße langsamer als das unbeladene Protein. Eine typische Zusammensetzung eines solchen Bindungsassays ist in Tabelle 3.17-1 dargestellt, es wurde ein Gesamtvolumen von 15 µL angesetzt.

Tab. 3.5.6-1. Zusammensetzung des Bindungsassays von MjAgo mit Nukleinsäuren; die Reaktion findet in NaGT-Puffer statt.

BSA	67 µg/mL
DTT	10 mM
Leitstrang	333 mM
Zielstrang	333 mM
Ago	2,8 µM

Die Bindungsreaktion wurde gestartet, indem die Reaktionslösung auf 65°C für 10 Minuten erhitzt wurde. Die Proben wurden mit dem Probenvolumen an Ficoll400-Ladepuffer

versetzt, auf ein 10% bzw. 12% natives Polyacrylamidgel geladen und anschließend wurden die Proben bei 200 V für 50 Minuten separiert. Visualisierung der Proben fand mittels Fluoreszenzdetektion der markierten DNA statt.

Zur Charakterisierung der Bindungsfähigkeit MjAgos wurden verschiedene Konstrukte genutzt. Diese umfassten einzelsträngige DNA [ssDNA] und RNA [ssRNA], doppelsträngige DNA [dsDNA] und RNA [dsRNA] und doppelsträngige Hybriden aus DNA und RNA [RNA/DNA bzw. DNA/RNA, mit Leitstrang/Zielstrang]. Dabei umspannen die Leitstränge eine Länge von 10 bis 21 Nukleotiden, die Zielstränge von 20 bis 41 Nukleotiden. Es befand sich je ein Fluoreszenzfarbstoff am Leitstrang (Atto550 oder Alexa647) oder Zielstrang (Alexa647 oder TAMRA). Die Farbstoffposition am Leitstrang wurde variiert, um Effekte in Abhängigkeit von der Farbstoffposition zu untersuchen. Dabei sind alle Farbstoffe, die nicht am 3'- beziehungsweise 5'-Ende positioniert sind, an ein Thymin gekoppelt. Alle Leitstränge weisen ein 5'-Phosphat [P] auf, die Zielstränge nicht. Zum Zeitpunkt der Versuchserstellung war kein Argonaute-Protein bekannt, dass eine effektive Prozessierung von Nukleinsäuren ohne 5'-Phosphatgruppe am Leitstrang durchführen konnte. Es wurde desweiteren ein Zielstrang mit nicht vollständig komplementärer Sequenz zum Leitstrang verwendet ("bubble"), um die Auswirkung einer unvollständigen Komplementarität auf die Bindung zu untersuchen.

3.6. Konfokale fluoreszenzbasierte Einzelmolekülmessungen

Zur Bestimmung der konformationellen Änderungen von MjAgo während der Bindung von einzel- und doppelsträngiger DNA wurden FRET-basierte Einzelmolekülmessungen durchgeführt. Dazu wurde 50 µL eines der jeweiligen MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure MjAgoN76AzF (unnatürliche Aminosäure p-Azido-L-phenylalanin in der N-terminalen Domäne an Aminosäureposition 76), MjAgoS221AzF (unnatürliche Aminosäure p-Azido-L-phenylalanin in der PAZ-Domäne an Aminosäureposition 221) oder MjAgoI410AzF (unnatürliche Aminosäure p-Azido-L-phenylalanin in der MID-Domäne an Aminosäureposition 410) mit 50 µM DyLight650 (Pierce, gelöst in Dimethylsulfoxid) bei 25°C für 30 Minuten inkubiert, wodurch der Farbstoff durch die Phosphingruppe mittels

der Staudinger-Bertozzi-Ligation an die Azidgruppe von p-Azido-L-phenylalanin gekoppelt wurde. Durch Zugabe von 10 mM DTT wurde die Reaktion gestoppt.¹⁵⁹

Das fluoreszenzmarkierte Protein wurde anschließend mit 4 μ M einzel- oder doppelsträngiger DNA für 20 Minuten bei 72°C inkubiert. Der dabei entstehende Komplex wurde von sowohl von freier DNA als auch freiem Farbstoff durch Größenausschlusschromatographie getrennt (Abschnitt 3.4.3) und ohne weitere Verzögerung für konfokale Einzelmolekülspektroskopie in Nunc Lab-Tek-Kammern (ThermoFisher) genutzt. Diese wurden zuvor mit einer BSA-Lösung (1 mg/mL) für 5 Minuten bei Raumtemperatur passiviert.

Der Übergang von konventionellen Messmethoden zu einzelmolekülbasierten Techniken benötigt eine Einstellung der zu messenden Fluoreszenzfarbstoffe auf picomolare Konzentrationen. Dies erfolgte durch Zugabe von NaGT-Puffer mit 10 mM DTT in LabTek-Kammern der Firma Nunc bis zur Unterscheidbarkeit einzelner Moleküle im Intensitäts-Zeit-Spektrum. Typische Verdünnungsfaktoren waren 1000 bis 10000. Eine genaue Bestimmung der Konzentration von Protein und DNA war in diesem Fall nicht mehr möglich.

Es wurde ein konfokales Fluoreszenzmikroskop mit alternierender Laseranregung verwendet, die Messung wurde ohne Immobilisierung durchgeführt. Dies ermöglichte zum einen eine Trennung zwischen Spezies mit einem und zwei Farbstoffen, wodurch Komplexe mit unmarkiertem Protein, markiertes Protein ohne gebundene DNA, freie DNA sowie freie Farbstoffe in der Datenanalyse aussortiert werden konnten. Zum anderen konnte durch Nutzung des FRET-2CDE-Filters bestimmt werden, ob der Abstand der Farbstoffe eines Komplexes mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen während des Passierens des Anregungsvolumen stabil war, wodurch eine Aussage über konformationelle Dynamik während der Messung getroffen werden konnte.^{140–142,177,178}

Die Alternierung der Illumination der Probe durch die Laser wurde durch Nutzung eines AOTFnc-VIS (*acousto-optical tunable filter*, optoelectronic) mit einer Periode von 100 μ s erreicht. Dadurch wurde jeder durch den Fokus diffundierende Farbstoff mehrmaligen, separaten Anregungen unterzogen. Die Anregung des Donor-Fluoreszenzfarbstoffs Atto550 erfolgte bei 532 nm durch den Diodenlaser Sapphire LP 532 nm 100 mW (115 μ W eingesetzte Leistung) mit kontinuierlicher Welle. Die Anregung des Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoffs DyLight 650 bei 640 nm fand durch den gepulsten Laser LDH-D-C-640

der Firma Picoquant (55 μ W eingesetzte Leistung) mit einer Pulsung von 80 MHz statt. Die Laser wurden in ein Ölimmersionsobjektiv eines invertierten Mikroskops (Olympus IX-71) mittels eines dualbandigen, dichroitischen Strahlteilers (Dualband z532/633, Firma AHF) eingekoppelt. Emittierte Fluoreszenz wurde durch das selbe Objektiv gesammelt, durch eine Lochblende mit 50 μ m Durchmesser (Linos) fokussiert und spektral durch einen dichroitischen Strahlteiler bei 640 nm (640DCXR, Firma AHF) aufgeteilt. Detektion von Donor- und Akzeptorfluoreszenz erfolgte durch zwei Avalanche-Photodioden (τ -SPAD-100, Firma Picoquant) mit vorherigem spektralen Filtern (Brightline HC582/75, Bandpass ET 700/75 nm, beide Firma AHF; RazorEdge LP 532, RazorEdge LP 647, beide Firma Semrock). Die Datenaufzeichnung erfolgte durch PC-Übertragung mittels des Verarbeitungsmoduls SPC-830 (Firma Becker&Hickl).

Die Analyse der Rohdaten erfolgte mittels nicht-kommerzieller LabView (National Instruments)-Software, bereit gestellt von Prof. Dr. Markus Sauer und Prof. Dr. Philip Tinnefeld. Erkennung von Fluoreszenzmolekülen anhand der Photonen-Zeitdichte erfolgte gemäß Nir et al., 2006¹⁴³ mit den Einstellungen $t = 500 \mu$ s, $M = 30$, $L = 100$. Die FRET-Effizienz sowie die Stöchiometrie jedes Moleküls konnten bestimmt werden, indem drei verschiedene Fluoreszenzwerte bestimmt wurden. Diese beinhalteten:

Donoremission während Donoranregung

$$F_D^D$$

Akzeptoremission während Akzeptoranregung

$$F_A^A$$

Akzeptoremission während Donoranregung

$$F_A^D$$

Die erhaltenen Werte wurden anschließend um den jeweiligen Hintergrund (1,3 kHz für F_D^D , 1,3 kHz für F_A^A , 1,0 kHz für F_A^D) korrigiert und für jedes Molekül die Stöchiometrie sowie die FRET-Effizienz bestimmt. Desweiteren wurde um den Faktor für Detektion von Donorfluoreszenz im Akzeptorkanal (*leakage*, lk), bestimmt aus der Donorfarbstoffpopulation, sowie für direkte Anregung des Akzeptorfarbstoffs während Donoranregung (*direct excitation*, dir), bestimmt aus der Akzeptorfarbstoffpopulation, korrigiert.¹⁴²

$$lk = \frac{F_A^D}{F_D^D} \quad (4)$$

$$dir = \frac{F_A^D}{F_A^A} \quad (5)$$

Damit ergibt sich der korrigierte FRET-Effizienzwert zu:

$$E = \frac{F^{FRET}}{F^{FRET} + F_D^D} \quad (6)$$

mit $F^{FRET} = F_A^D - lk \cdot F_D^D - dx \cdot F_A^A$

Die genutzte Alternierung der Anregung ermöglicht desweiteren die Bestimmung des Stöchiometriefaktors:

$$S = \frac{F^{FRET} + F_D^D}{F^{FRET} + F_D^D + F_A^A} \quad (7)$$

Aufgrund des schlechten Verhältnisses von Komplexen mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen zu Spezies mit Einfachmarkierung war eine weitere Filterung der erhaltenen Daten notwendig. Dazu wurden nach Tomov et al., 2012 alle Messdaten durch den ALEX-2CDE und FRET-2CDE-Filter weiter aufgearbeitet.¹⁷⁷

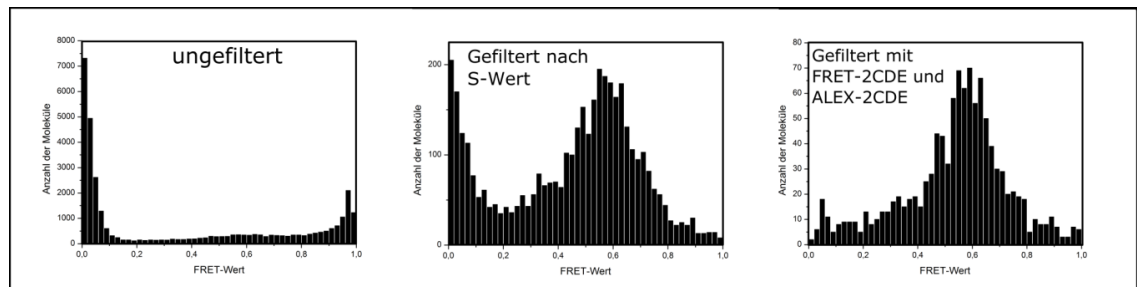


Abb 3.6-1. Bedeutung der angewandten Filter für die Auswertung der Messung. (A) Die ungefilterten Werte lassen keine FRET-Population erkennen. Bei $E \sim 0$ befinden sich Donorfarbstoffe ohne Akzeptorfarbstoffe bzw. ohne fluoreszenzaktive Akzeptorfarbstoffe. Bei $E \sim 1$ befinden sich Akzeptorfarbstoffe ohne Donorfarbstoffe bzw. ohne fluoreszenzaktive Donorfarbstoffe. (B) Ausschließliche Betrachtung von FRET-Werten mit einem Stöchiometrie-Wert zwischen 0,3 und 0,7. Die FRET-Population bei $E \sim 0,5$ ist deutlich erkennbar, die Akzeptorfarbstoffe ohne Donorassoziiierung sind nicht mehr im Histogramm vertreten. (C)

Anwendung der ALEX-2CDE- und FRET-2CDE-Filter isoliert die FRET-Population durch Elimination der akzeptorfreen Donorfarbstoffe.

Der FRET-2CDE-Filter untersucht durch eine Verteilungsfunktion die Stabilität des FRET-Effizienzwertes während der Passage des Moleküls durch den Anregungsbereich (Gleichung (8)). Dies ermöglicht die Trennung dynamischer Komplexe von Komplexen mit stabiler Konformation. Sehr starke Dynamik weist zum einen auf unspezifische Komplexe mit instabiler Struktur hin.

$$FRET - 2CDE(t_{(CHD)}, t_{(CHA)}) = 110 - 100 \cdot [(E)_D + (1 - E)_A] \quad (8)$$

Mit CHA : Akzeptorkanal, CHD : Donorkanal, $(E)_D$ stellt den mittleren FRET-Effizienzwert in der Umgebung der Donorphotonen dar, $(1-E)_A$ stellt den Mittelwert der von 1 subtrahierten FRET-Effizienz in der Umgebung der Akzeptorphotonen dar. Beide zuletzt angesprochenen Mittelwerte sind durch eine zeitabhängige Photonendichtefunktion definiert.

Zum anderen ist im Falle starker Dynamik der ermittelte FRET-Wert ohne Filterung lediglich ein Durchschnittswert und lässt keine Aussage über die vorliegende Struktur zu. Eine Auftragung der ermittelten FRET-Werte gegen die zugehörigen FRET-2CDE-Filterwerte ermöglicht im Umkehrschluss die Aussage, ob Dynamik während des Messvorgangs vorlag. Dabei ist zu beachten, dass eine Dynamik nur dann erkennbar ist, wenn diese im Bereich der Zeitauflösung der Messmethode oder langsamer abläuft. Im vorliegenden Fall des konfokalen Fluoreszenzmikroskops ist die APD die limitierende Komponente, mit einer Zeitauflösung von bis zu 350 ps.

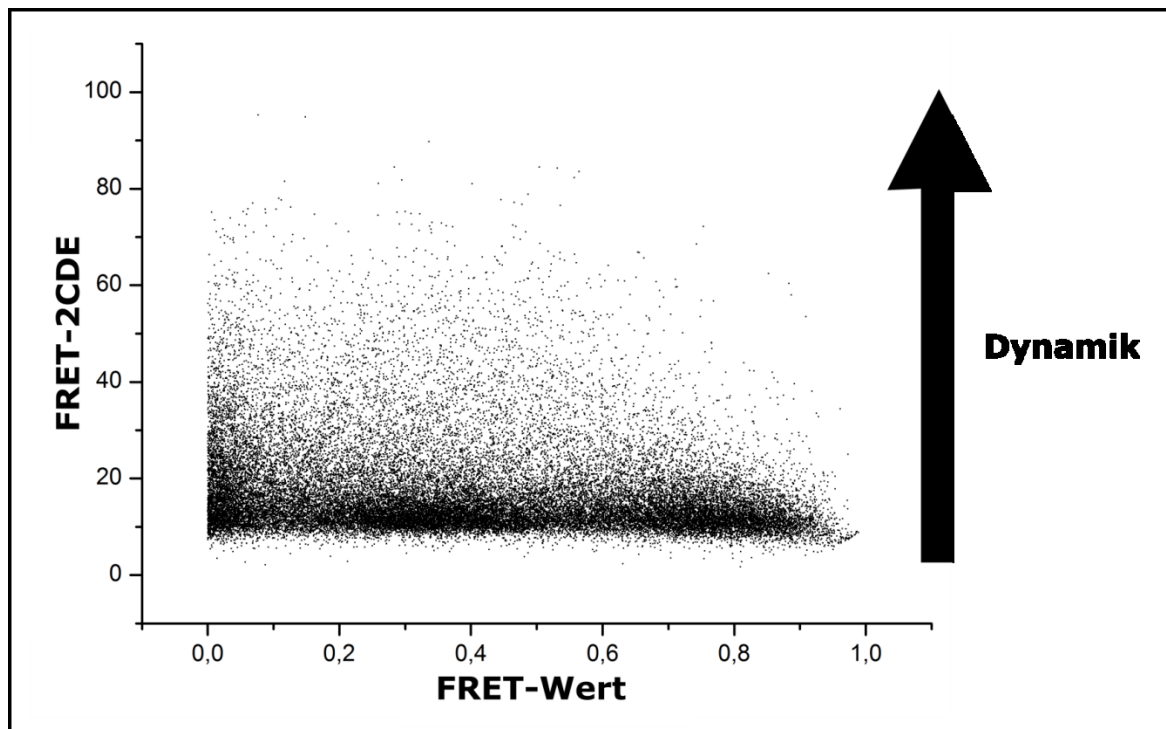


Abb. 3.6-2. Aufklärung der Dynamik. Auftragung der FRET-2CDE-Werte gegen die zugehörigen FRET-Werte zur Bestimmung potentiell vorliegender Dynamik Abstands der gemessenen Farbstoffe. So höher der FRET-2CDE-Wert, umso dynamischer ist das Verhalten des FRET-Paares während der Messung. Mit dieser Methode kann lediglich der Abstand der Farbstoffe betrachtet werden, eine Aussage über die Herkunft potentieller Bewegung (Konformationsänderung des Proteins, Bewegung der Farbstoffe an ihren Linkern in Relation zueinander, photochemische Beeinflussung der Farbstoffe) kann nicht getroffen werden.

Eine ähnliche Verteilungsfunktion nutzt der ALEX-2CDE-Filter. Dieser betrachtet nicht die Übertragungseffizienz der Fluoreszenz, sondern die Stabilität der Helligkeit der einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe innerhalb des zuvor als Moleküls identifizierten Signals und bildet ein Verhältnis der Stabilität der Helligkeit beider Farbstoffe zueinander. Bleichende Farbstoffe sowie colokalisierte, nicht-komplexierte Farbstoffe können so anhand ihrer Instabilität der Helligkeit identifiziert und aussortiert werden. Aufgrund des instabilen Helligkeitsverhältnisses findet bei diesen Molekülen eine Verzerrung sowohl des Stöchiometriewertes als auch des FRET-Wertes statt, sodass mit diesen Werten keine sinnvolle Aussage über den inter- oder intramolekularen Abstand getroffen werden kann. Alle Messwerte wurden mit Hilfe des FRET-2CDE- und ALEX-2CDE-Filter bereinigt. Da nur Komplexe mit zwei Farbstoffen eine strukturelle Relevanz hatten, wurden nur Proben mit einem S-Wert zwischen 0,3 und 0,7 betrachtet. Donorfärbstoffe ohne Akzeptorfärbstoffe bzw. ohne fluoreszenzaktiven Akzeptorfärbstoff weisen einen S-Wert von ~ 1 auf, Akzeptorfärbstoffe ohne Donorfärbstoff bzw. ohne fluoreszenzaktiven Donorfärbstoff

einen S-Wert von ~ 0. Im Zuge der physikalischen Sinnhaftigkeit wurden alle Messwerte mit einem E-Wert größer als eins oder kleiner als null nicht beachtet. Für alle Messungen wurde ein FRET-2CDE-Filter angewendet, der nur Moleküle mit einem FRET-2CDE-Wert von 8 bis 12 für die weitere Betrachtung zuließ. Die gleichen Werte wurden für den ALEX-2CDE-Filter genutzt, welcher ebenfalls auf alle Messungen angewendet wurde.

3.7. Western Blot

Mit diesem Versuch sollte zum einen der mit rekombinantem MjAgo erzeugte Antikörper auf seine Detektionsfähigkeit bezüglich des endogenen MjAgos hin geprüft werden. Desweiteren sollte geprüft werden, ob eine nachweisbare Menge an Protein in *Methanocaldococcus jannaschii* vorliegt. Dies erfolge mittels eines WesternBlots nach Towbin.¹⁷⁹

Dazu wurden *Methanocaldococcus jannaschii*-Zellen fünf wiederholten Zyklen aus Gefrieren bei -80°C mit anschließendem Auftauen bei 37°C im Wasserbad ausgesetzt. Anschließend erfolgte die Phasentrennung zwischen wässriger und fester Phase bei 10000 x g für 30 Minuten und der die DNA enthaltende Überstand wurde abgenommen. Das Gel aus der darauf folgenden denaturierenden SDS-PAGE mit Proben des Überstands wurde auf eine Nitrocellulosemembran bei 10 V für 50 Minuten übertragen.

Dabei wurde das Verfahren des diskontinuierlichen halbtrockenen Western Blots genutzt, welches die Transferleistung durch Erhöhung der Bindungsfähigkeit des Proteins an die Nitrocellulosemembran mittels des auf der Anodenseite im Puffer vorhandenen Ethanol verbessert und gleichzeitig durch das im Kathodenpuffer befindliche Natriumdodecylsulfat eine stärkere Migration aus dem Polyacrylamid hervorruft. Der Elektrodenkontakt wurde über 4 Whatmanpaper (Stärke: je 3 mm) hergestellt, die im jeweiligen Puffer getränkt waren.

Unspezifische Bindungen im weiteren Verlauf wurden mit einer 5%igen Caseinlösung in TBS-T über Nacht blockiert. Daraufhin wurde dreimal für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und mit 1 µg/mL monoklonaler Primärantikörperlösung (Antibody Facility, Braunschweig) in TBS-T für eine Stunde inkubiert. Nach weiterem dreimaligen waschen mit TBS-T wurde der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa647 gekoppelte Ziege-Antimaus-Zweitantikörper für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Die Visualisierung erfolgte durch Fluoreszenzdetektion nach erneutem waschen mit TBS-T.

3.8. Homologiemodell

Das Homologiemodell von MjAgo basierend auf PfAgo wurde von Daniel Klose, beschrieben in Zander et al., 2014,¹⁸⁰ erstellt.

4. Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit umfasste drei Teilschritte:

1. Etablierung eines Expressions- und Reinigungsprotokolls zum Erhalt von MjAgo in absoluter Reinheit und einer Menge, die die biochemische und strukturelle Charakterisierung ermöglicht. Da das Protein bisher nicht charakterisiert wurde, mussten ebenfalls Bindungs- und Aktivitätsassays zur Aufklärung der nutzbaren Substrate etabliert werden.
2. Etablierung und Durchführung von FRET-basierten Einzelmolekülstudien zur Aufklärung der konformationellen Reorganisation von MjAgo während der Bindung von Nukleinsäuren. Dies umfasste die Integration einer unnatürlichen Aminosäure in MjAgo, Expression und Aufreinigung der damit erhaltenen MjAgo-Derivate, Kopplung eines Farbstoffs an diese unnatürliche Aminosäure mit anschließender Bildung eines Komplexes mit einzel- oder doppelsträngiger DNA, Isolation des Komplexes und Durchführung der konfokalen Einzelmolekülmessungen.
3. Aufklärung der biologischen Funktion von MjAgo. Dazu wurde untersucht, welchen Einfluss Modifikationen der Nukleinsäure auf die Prozessierung durch MjAgo haben, um dadurch Rückschlüsse auf vorgeschaltete Prozesse sowie bevorzugte Substrate MjAgos ziehen zu können. Dabei wurde ein Mechanismus entdeckt, der es MjAgo erlaubt, plasmidale und genomische DNA zu prozessieren. Desweiteren wurde der Nachweis erbracht, dass MjAgo konstitutiv in *Methanocaldococcus jannaschii* exprimiert wird. Auf Grundlage dessen soll eine Einordnung MjAgos in das zelleigene Immunsystem von *Methanocaldococcus jannaschii* vorgenommen werden.

4.1. Expression, Aufreinigung und Fluorophorkopplung an MjAgo

Es konnte erfolgreich ein Expressionsprotokoll in *E. coli* erstellt werden, welches zur Überexpression relevanter Mengen von MjAgo mit 6x-Histidin-Tag genutzt wurde. Dabei wurden die Zellen in LB-Medium kultiviert und die Expression bei einer hohen optischen Dichte von 1,2 mit IPTG induziert. Nach über Nacht erfolgter Überexpression konnte das unmutierte MjAgo durch Ultraschallbehandlung der Zellen mit anschließender Hitzebehandlung (85°C für 45 Minuten) des Überstands zur Denaturierung der *E. coli*-Proteine und abschließender IMAC mit Stoßelution in hoher Reinheit und hochkonzentriert mit einer durchschnittlichen Ausbeute von $11 \pm 1,8 \cdot 10^{-5} \frac{\text{mg Protein}}{\text{mL Kultur}}$

gefunden werden (Abb. 4.1-1). Die für die Einzelmolekülstudien genutzten MjAgo-Derivate wiesen eine geringere Hitzestabilität (75°C für 30 Minuten) auf, sodass leichte Verunreinigungen nach der IMAC gefunden wurden. Diese Verunreinigungen wurden, im Gegensatz zu den MjAgo-Derivaten mit integrierter unnatürlicher Aminosäure, nicht von den Farbstoffen markiert (Abb. 4.1-3).

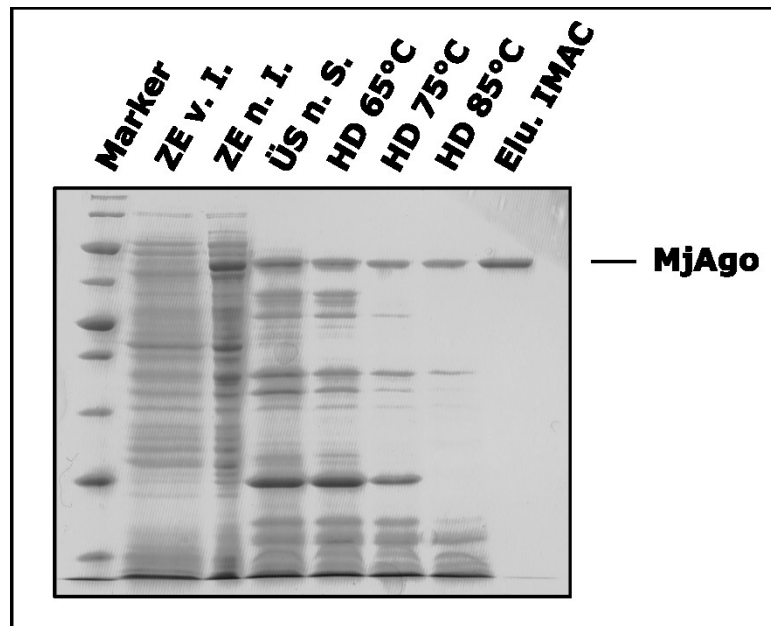


Abb. 4.1-1. Isolation des MjAgo-Wildtyps. 10%ige SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. ZE v. I. bezeichnet den Zellextrakt entnommen vor Induktion der Expression, ZE n. I. den Zellextrakt nach Induktion der Expression. ÜS n. S. stellt den Überstand nach Ultraschallaufschluss der Zellen dar, die Expression wurde bereits für 4 Stunden durchgeführt. HD 65°C, HD 75°C und HD 85°C zeigen den erhaltenen Überstand nach Phasentrennung durch Zentrifugation nach Hitzedenaturierung für 30 Min bei 65°C, 75°C bzw. 85°C. Elu. IMAC zeigt das isolierte MjAgo-Protein nach Affinitätschromatographie. Die durchgeführte Hitzedenaturierung denaturiert erfolgreich die Proteine von *E. coli*, MjAgo bleibt davon unberührt. Abschließende Ni-Affinitätschromatographie isoliert das gewünschte Protein.

Das Reinigungsprotokoll mit Modifikation der für die Denaturierung der *E. coli*-Proteine genutzten Temperatur von 85°C auf 75°C konnte ebenfalls auf die MjAgo-Derivate im weiteren Verlauf angewendet werden (Abb. 7.4-1). Es wurden drei Positionen für den Fluoreszenzfarbstoff im Protein gewählt, dazu wurde jeweils eine Mutante mit einer unnatürlichen Aminosäure erzeugt (Abb. 4.1-2).

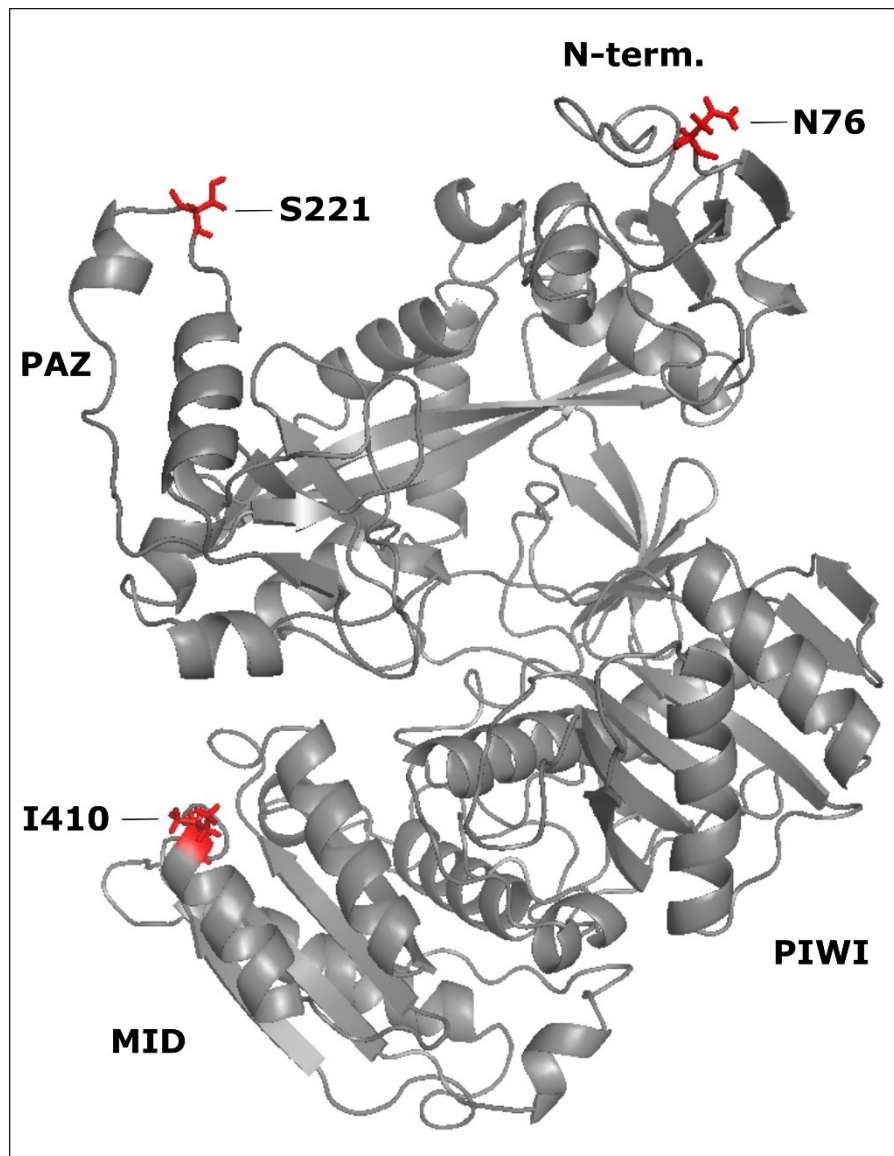


Abb. 4.1-2. Positionen der unnatürlichen Aminosäure im Homologiemodell MjAgo mit PfAgo. Die drei Positionen, je eine in PAZ- (Serin221), MID- (Isoleucin410) und N-terminaler Domäne (Asparagin76) sind in rot markiert.

Die für die Einzelmolekülstudien genutzten Derivate konnten erfolgreich mit Fluoreszenzfarbstoffen durch die bioorthogonale Staudinger-Bertozzi-Ligation ortsgerichtet an der unnatürlichen Aminosäure markiert werden.

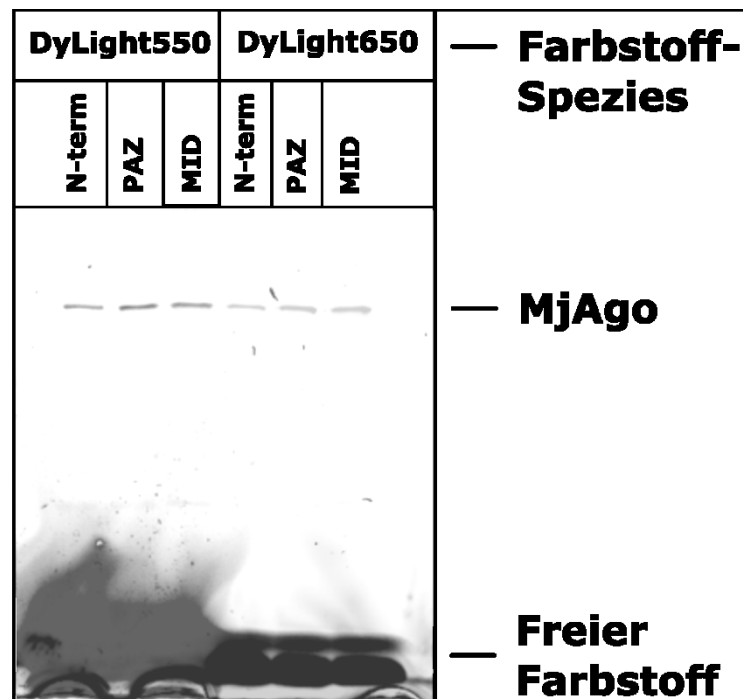


Abb. 4.1-3. Markierungsnachweis. Farbstoffinkorporation in die Einzelmolekülmutanten analog zum Vorgehen für die EinzelmolekülStudien. Es wurde sowohl DyLight550 als auch DyLight650 getestet, die Markierung erfolgte für alle Derivate mit beiden Farbstoffen. Die Trennung der markierten Proteine von den freien Farbstoffen erfolgte durch 12%ige SDS-PAGE mit anschließender Detektion der Fluoreszenzsignale.

Die Mutanten mit einer einzelnen unnatürlichen Aminosäure zeigen in der SDS-PAGE keine weiteren markierten Spezies nach Kopplung eines Farbstoffs (DyLight550 bzw. DyLight650, Abb. 4.1-3), da der 6xHis-Tag C-terminal positioniert ist und demnach nur Volllängenproteine durch die IMAC aufgereinigt werden.

4.2. Bindungsfähigkeit und Aktivitätsbestimmung von MjAgo

4.2.1. Nukleinsäurebindungsfähigkeit von MjAgo

Electro Mobility Shift Assays konnten zeigen, dass MjAgo in der Lage ist, sowohl einzel- als auch doppelsträngige DNA-Konstrukte zu binden. Auch ein Hybrid aus DNA-Leitstrang und RNA-Zielstrang wurde erfolgreich gebunden (Abb. 4.2.1-1).

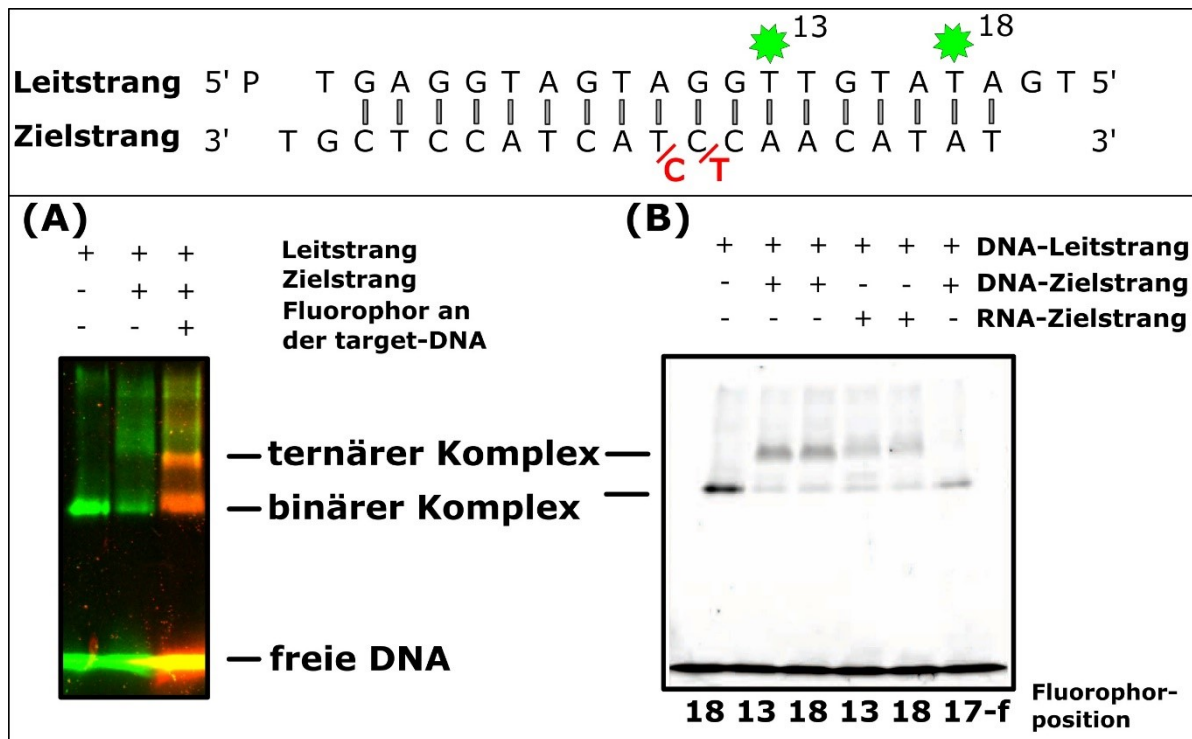


Abb. 4.2.1-1. Bindungsassay von MjAgo mit DNA und RNA. Es wurden 2,8 μ M MjAgo zusammen mit je 333 nM Nukleinsäuren bei 65°C für 10 Minuten inkubiert und die Moleküle nach Zugabe von Ficoll400-Ladepuffer über eine 10%ige native Polyacrylamidgelelektrophorese separiert. Die Sequenzen der verwendeten DNA-Konstrukte sind aufgeführt. Dabei ist als grüner Stern die Farbstoffposition angegeben, in rot die Änderung der Sequenz für das Konstrukt mit ungepaarter Stelle an Position 10/11. (A) Der Fluoreszenzfarbstoff Atto550 befindet sich an Position 18 (gezählt vom 5'-Ende) des T-Leitstrangs (dargestellt in grün), Alexa647 am Zielstrang (dargestellt in rot), Kolokalisation beider Farbstoffe ist in gelb dargestellt. Die Zugabe und Bindung eines DNA-Zielstrangs zusätzlich zum Leitstrang führt zu einer Verringerung der zurückgelegten Laufstrecke im Gel durch den vergrößerten ternären Komplex im Verhältnis zum binären Komplex bestehend aus MjAgo und Leitstrang. (B) Atto550 befindet sich an der angegebenen Position (13 oder 18 gezählt vom 5'-Ende) des Leitstrangs. Es befindet sich kein Farbstoff am DNA-Zielstrang. Der ternäre Komplex kann sowohl für einen DNA- als auch für einen RNA-Zielstrang detektiert werden, sofern keine ungepaarte Stelle zwischen den beiden Strängen (17-f) auftritt. Es findet keine vollständige Absättigung des Leitstrangs mit DNA-Zielstrang statt, sodass zusätzlich zum binären immer auch ein ternärer Komplex auffindbar ist.

MjAgo bindet bei Verwendung eines Leitstrangs sowohl RNA- als auch DNA-Zielstränge, letztere mit höherer Effektivität und damit Spezifität. Eine ungepaarte Stelle an Position

10/11 zwischen den Strängen wird nicht toleriert, obwohl sich diese außerhalb der Seed-Region anderer Argonauten befindet.⁵⁷ Durch Verwendung verschiedener Positionen des Farbstoffs am Leitstrang konnte der Einfluss der Markierungsposition auf die Bindungsfähigkeit MjAgo weiter untersucht werden (Abb. 4.2.1-2). Dabei sollte auch die optimale Markierungsposition für die nachfolgenden Einzelmolekülmessungen festgestellt werden.

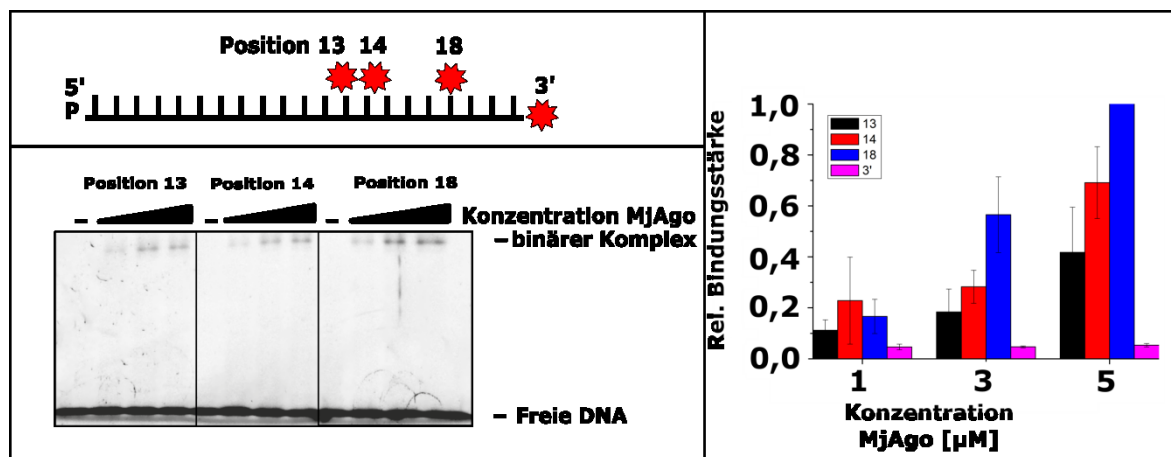


Abb. 4.2.1-2. Bindungsassay von MjAgo mit T-Leitstrang. Es wurden 0, 1, 3 und 5 μM MjAgo zusammen mit 333 nM T-Leitstrang bei 65°C für 10 Minuten inkubiert und nach Zugabe von Ficoll400-Ladepuffer über 10%ige native Polyacrylamidgelelektrophorese separiert. Der Farbstoff Atto550 befindet sich an der angegebenen Position des Leitstrangs. P ist eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA. Die Bindung ist am effektivsten, wenn sich der sterisch anspruchsvolle Farbstoff näher am 3'-Ende des Leitstrangs befindet, allerdings annähernd nicht mehr vorhanden bei Positionierung am 3'-Ende (Anhang Abb. 7.3-1). Die Effektivität der Bindung ist relativ zur maximalen Bindungsfähigkeit bei Verwendung des Leitstrangs mit Atto550 an Position 18 angegeben. Es wurden drei unabhängige Experimente zur Quantifizierung genutzt.

Die sterisch anspruchsvolle Struktur des Farbstoffs verhindert eine Bindung bei Kopplung an das 3'-Ende der DNA und verringert die Effizienz der Bindung bei Kopplung an Position 13 und 14, verglichen mit einem an Position 18 gekoppelten Farbstoff. Die Verankerung des 3'-Endes des Leitstrangs in der PAZ-Domäne ist für die Bindung eines Einzelstrangs so wichtig, dass ein sterisch anspruchsvolles Molekül an dieser Stelle die Bindung annähernd vollständig unterdrückt, sodass der zentrale Bereich des Leitstrangs als essentiell für die Bindung der Nukleinsäuren an MjAgo identifiziert werden kann.

4.2.2. Nukleaseaktivität von MjAgo

Nicht alle bekannten Argonaute-Proteine sind katalytisch aktiv. Zur Klärung, ob MjAgo eine aktive Nuklease darstellt, wurde ein Aktivitätsassay etabliert. Dabei wird MjAgo zusammen mit Nukleinsäuren erhitzt und die dabei entstehenden Reaktionsprodukte durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Es erfolgt die basengenaue Auftrennung der Nukleinsäuren, wodurch eine eindeutige Betrachtung der Prozessierungsprodukte ermöglicht wird. Probennahme zu verschiedenen Zeitpunkten erlaubt die Untersuchung zeitabhängiger Vorgänge.

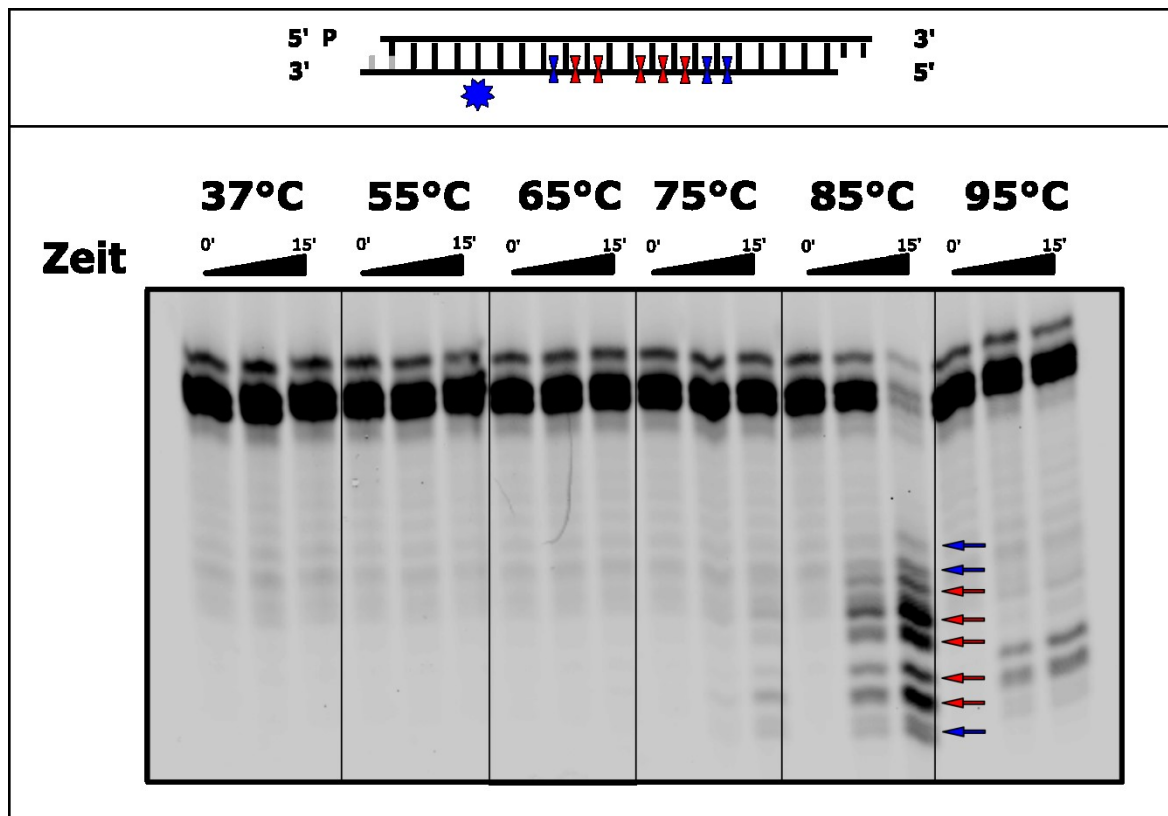


Abb. 4.2.2-1. Aktivitätsassay von MjAgo bei verschiedenen Reaktionstemperaturen. Es wurde jeweils 666 nM p17-AF-Zielstrang und 333 nM T-Leitstrang zusammen mit 3 μ M MjAgo bei den angegebenen Temperaturen inkubiert und die Produkte der Reaktion über 15%ige denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Es befindet sich eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des Leitstrangs. Die Fluoreszenzmarkierung Alexa647 des Zielstrangs an Position 17 (gekennzeichnet durch den blauen Stern) wurde mithilfe eines Fluoreszenzscanners detektiert. Proben wurden zu den Zeitpunkten 0, 7,5 und 15 Minuten genommen. Für 37°C bis 65°C ist keine Degradation der DNA erkennbar, ab 75°C sind die Abbauprodukte im niedermolekularen Bereich sichtbar. Die Aktivität ist bei 85°C am höchsten. Es entstehen fünf Hauptprodukte einer Länge von 10, 11, 13, 14, 15 Nukleotiden (gekennzeichnet durch rote Pfeile) sowie drei Nebenprodukte einer Länge von 9, 16 und 17 Nukleotiden (gekennzeichnet durch blaue Pfeile). Die für die Hauptprodukte notwendigen Schnittstellen sind im Schema rot gekennzeichnet, für die Nebenprodukte in blau.

Zunächst sollte geklärt werden, unter welchen Temperaturbedingungen die hydrolytische Aktivität MjAgos stattfindet. *Methanocaldococcus jannaschii* lebt als thermophiler Organismus bei einer Temperatur von ca. 85°C,⁹ sodass ein Temperaturbereich von 37°C bis 95°C untersucht wurde. (Abb. 4.2.2-1)

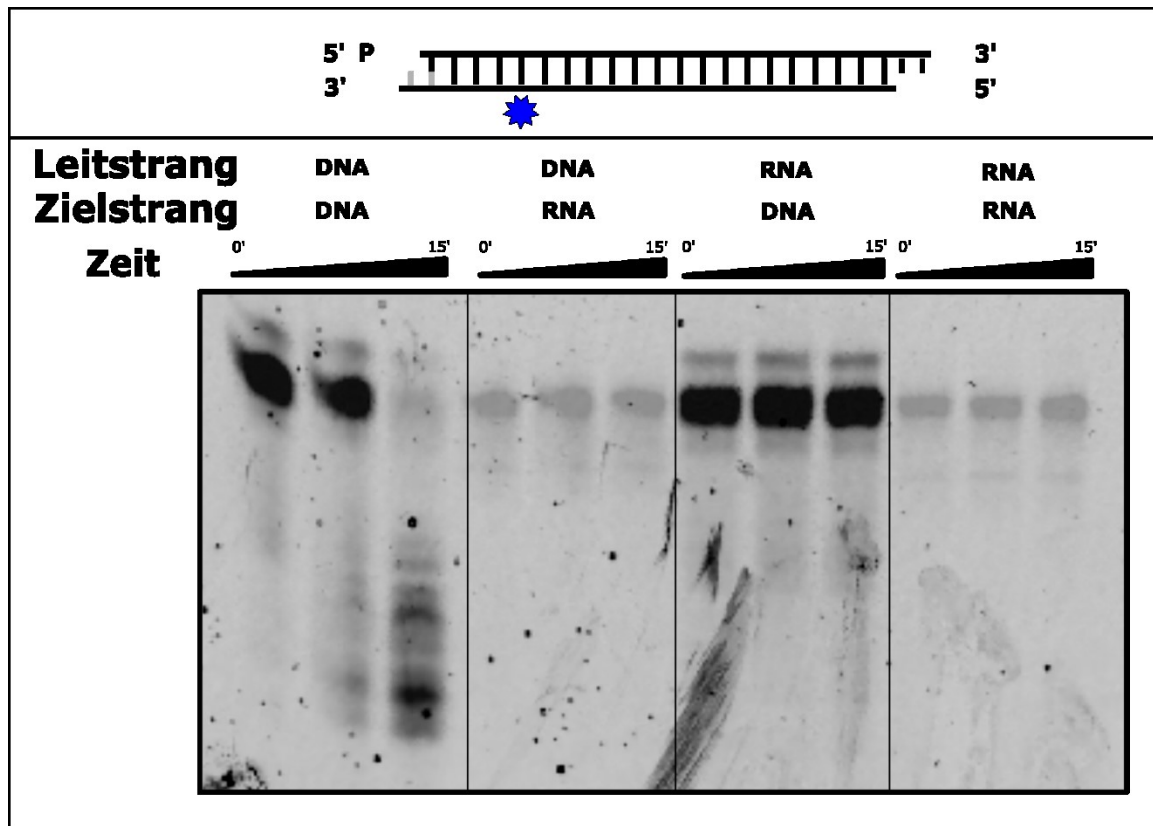


Abb. 4.2.2-2. Aktivitätsassay von MjAgos mit DNA und RNA sowie deren Hybriden. Es wurden 3 μ M MjAgos, 500 nM Leitstrang und 1 μ M Zielstrang bei 85°C eingesetzt und die Produkte über 12%ige denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Die Fluoreszenzmarkierung (p17AF-Zielstrang mit Alexa647, Zielstrang-RNA p17-TAMRA mit TAMRA, beide an Position 17, blauer Stern) des Zielstrangs wurde detektiert. Es befand sich eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des Leitstrangs. Probenahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 7,5 und 15 Minuten. Die jeweils eingesetzte Spezies an Nukleinsäuren ist im Bild gekennzeichnet. Eine Degradation der Nukleinsäuren findet nur im Falle doppelsträngiger DNA statt, die Anwesenheit von RNA unterdrückt jegliche Reaktion. Das schwächere Signal für den RNA-Zielstrang entsteht durch den verwendeten Farbstoff TAMRA, welcher eine schlechtere Detektion unter den gegebenen Bedingungen gewährt als der am DNA-Zielstrang gekoppelte Farbstoff Alexa647.

Dabei wurde eine Aktivität oberhalb von 75°C mit einem Aktivitätsmaximum bei 85°C gefunden. Da bei Temperaturen unterhalb von 75°C eine Bindung ohne Schnittaktivität gefunden wurde, ergab sich damit die einzigartige Möglichkeit, Bindung und nukleolytische Aktivität MjAgos getrennt voneinander beobachten zu können, ohne weitere Modifikation

jeglicher Art. Bei 95°C nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab, verglichen mit der Umsetzung bei 85°C. Es wird auch eine geringere Anzahl an Produkten gefunden.

Im Gegensatz zu anderen Vertretern der Argonaute-Familie entstehen fünf Produkte bei der Prozessierung mit MjAgo mit annähernd gleicher Konzentration und jeweils einem Nukleotid Größenunterschied zum nächsten Produkt (Hauptprodukt) und drei Produkten in niedriger Konzentration (Nebenprodukt).

Es wurde sodann geprüft, welche Nukleinsäurespezies prozessiert werden (Abb. 4.2.2-2). Für prokaryotische Argonaute-Proteine konnte die Prozessierung sowohl von DNA- als auch RNA-Konstrukten gezeigt werden.^{33,43,44,88,100,101} Zur Identifikation der Substrate MjAgos wurden doppelsträngige Konstrukte aus DNA/DNA, RNA/RNA, DNA/RNA und RNA/DNA im Aktivitätsassay (Abb. 4.2-4) eingesetzt.

Einzig DNA/DNA-Konstrukte werden von MjAgo prozessiert, RNA-enthaltende Konstrukte werden trotz Bindung nicht geschnitten. MjAgo muss demnach als endonukleolytische DNase klassifiziert werden. Exklusivität für eine Nukleinsäurespezies bzw. eine spezielle Leitstrang-Zielstrang-Zusammensetzung konnte auch für andere Vertreter der Argonaute-Familie beobachtet werden, z.B. für das humane Argonaute2, *Thermus thermophilus* Argonaute oder *Pyrococcus furiosus* Argonaute^{29,43,100}. Prozessierung von DNA-Zielsträngen schließt eine posttranskriptionale Regulation von mRNA durch deren Prozessierung aus. Wie bei anderen Vertretern der Argonaute-Familie konnte auch bei MjAgo anhand eines Aktivitätsassays (Abb. 4.2.2-3) gezeigt werden, dass einzelsträngige Substrate nicht verarbeitet werden, sondern ein Konstrukt aus Leitstrang und Zielstrang notwendig ist.

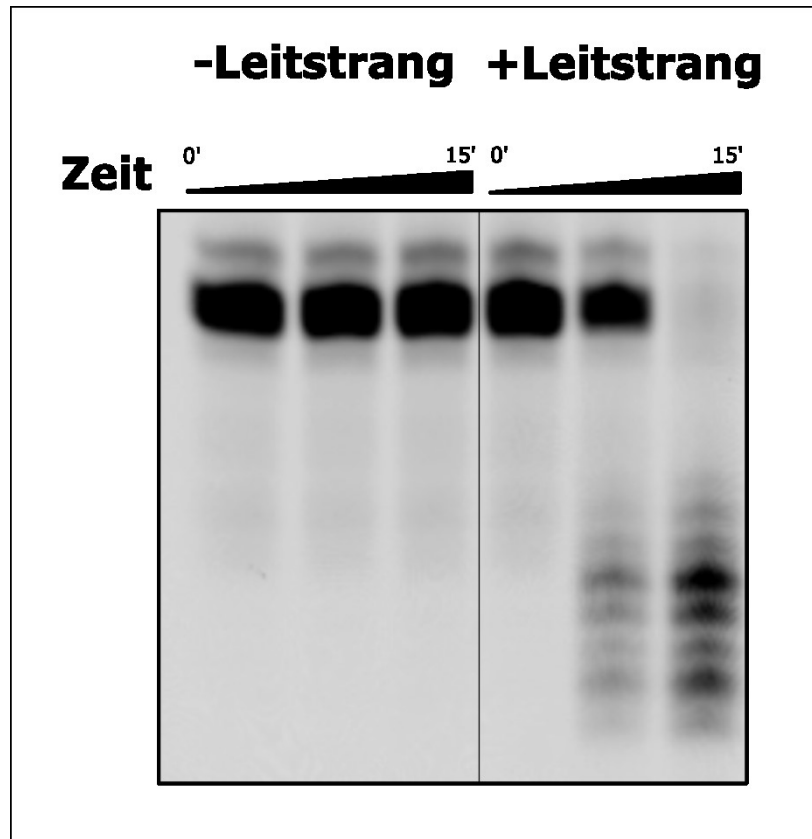


Abb. 4.2.2-3. Aktivitätsassay von MjAgo mit und ohne Leitstrang. Es wurden 3 μM MjAgo und 666 nM p17-AF-Zielstrang und 333 nM Leitstrang bzw. nur p17-AF-Zielstrang bei 85°C inkubiert, die Produkte über 15%ige denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese getrennt und die Fluoreszenzmarkierung des Zielstrangs detektiert. Der Leitstrang wies eine 5'-Phosphatgruppe auf. Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 7,5 und 15 Minuten. Ohne Verwendung eines komplementären DNA-Strangs konnte keine Prozessierung der DNA beobachtet werden.

Damit ist MjAgo ein katalytisch aktiver Vertreter der Argonaute-Familie und in der Lage, bei hohen Temperaturen ausschließlich doppelsträngige DNA zu prozessieren. Der vollständige Abbau des im Überschuss vorliegenden Zielstrangs zeigt, dass mit einem Leitstrang mehrere Zielstränge prozessiert werden können. Eine Methode zur Formung des binären und ternären Komplexes konnte ebenso wie eine Möglichkeit zur Kopplung der Fluoreszenzfarbstoffe an die MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure etabliert werden.

4.3. Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Das erste Nukleotid des Leitstrangs

In der humanen RNA-Interferenz werden die Leitstränge für das humane Argonaute aus einem vorgeschalteten, mehrstufigen Prozess aus Vorläufermolekülen unter Beteiligung diverser Enzyme (z.B. Drosha, Dicer) bereit gestellt.¹⁸¹ Ein solches oder auch nur ähnliches

System ist weder für Archaeen und Bakterien im Allgemeinen noch für MjAgo im speziellen bekannt, sodass die Zusammensetzung der natürlich genutzten Leitstränge nicht bekannt ist.

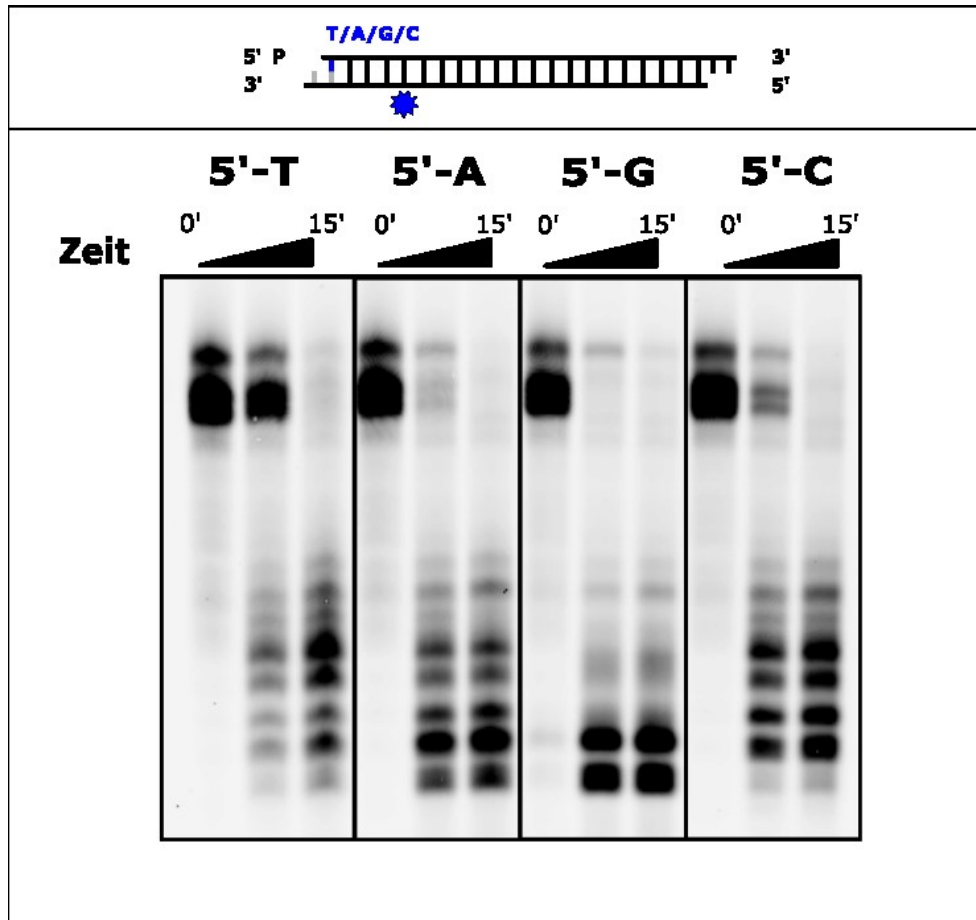


Abb. 4.3-1. Einfluss des ersten Nukleotids. 666 nm p17-AF-Zielstrang und 333 nm T-, A-, G- bzw. C- Leitstrang wurden zusammen mit 3 μ M MjAgo für die angegebene Zeit inkubiert und über denaturierende 15%ige Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Anschließend wurde die Fluoreszenzmarkierung des Zielstrangs (Alexa647 an Position 17, blauer Stern) detektiert. Probennahme zu den Zeitpunkten 0, 7,5 und 15 Minuten. An allen Leitsträngen befand sich eine 5'-Phosphatgruppe. In der Sequenz ist das ausgetauschte Nukleotid blau markiert. Im Falle eines Guanin am 5'-Ende konnte eine Änderung des Schnittmusters im Vergleich zu Thymin, Adenin und Cytosin an der selben Position gefunden werden. Dabei werden die Hauptprodukte auf zwei Größen reduziert, es treten zwei schwache Nebenprodukte mit jeweils zwei Nukleotiden Abstand zum größten Hauptprodukt bzw. zum kleineren Nebenprodukt auf. Die Degradationsgeschwindigkeit ist für den G- und für den A-Leitstrang im Vergleich zu den beiden anderen erhöht.

Immunopräzipitationen von endogenen und rekombinanten Argonauten zeigten bei einigen Vertretern der Familie der Argonauten eine Akkumulation eines bestimmten Nukleotids am 5'-Ende des Leitstrangs.^{43,100,104} Dessen Einfluss auf das Schnittverhalten MjAgos wurde untersucht. Dazu wurde das erste Nukleotid des Leitstrangs, gezählt vom 5'-Ende, ausgetauscht und Aktivitätsassays durchgeführt (Abb. 4.3-1).

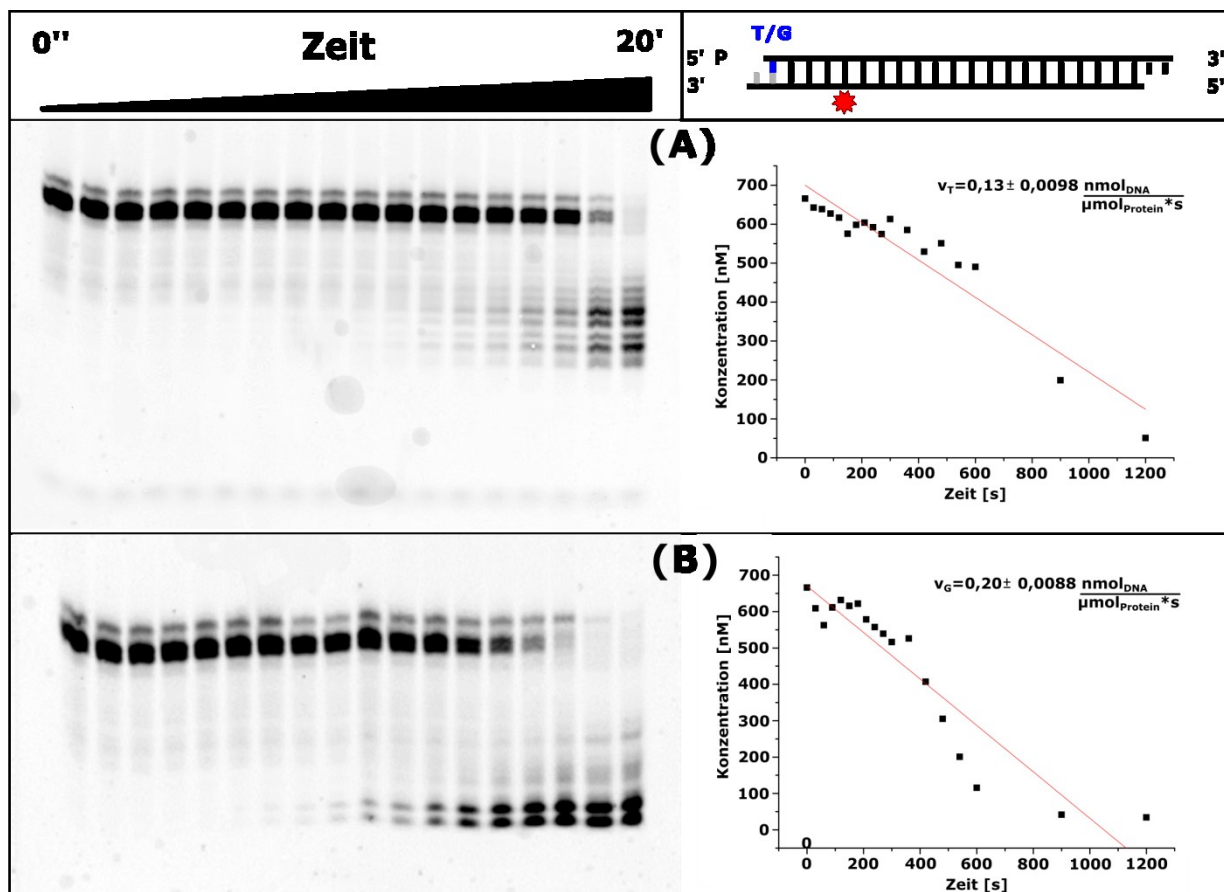


Abb. 4.3-2. Vergleich der Umsatzrate MjAgos in Abhängigkeit vom 5'-Nukleotid des Leitstrangs. Es wurden je 3 μM MjAgo mit 333 nM Leitstrang (T-Leitstrang oder G-Leitstrang, beide mit 5'-Phosphatgruppe) und 666 nM p17-AF-Zielstrang bei 85°C umgesetzt. Die Fluoreszenzmarkierung des Zielstrangs (Alexa647 an Position 17, roter Stern im Konstruktschema) wurde nach denaturierender Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese der Produkte detektiert. Probennahme mit Reaktionsstopp erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 30 s, 60 s, 90 s, 120 s, 150 s, 180 s, 210 s, 240 s, 270 s, 300 s, 360 s, 420 s, 480 s, 540 s, 600 s, 900 s, 1200 s. Es wurden die Umsatzraten mit dazugehörigen Standardabweichungen aus je 3 unabhängigen Experimenten bestimmt. Das ausgetauschte Nukleotid (5'-Ende, Thymin oder Guanin) ist in der Sequenz blau markiert. (A) Abbau unter Einfluss des T-Leitstrangs mit einer Umsatzrate von $0,13 \text{ nmol}_{DNA} / \mu\text{mol}_{Protein} * s$ (B) Abbau unter Einfluss des G-Leitstrangs mit einer Umsatzrate von $0,2 \text{ nmol}_{DNA} / \mu\text{mol}_{Protein} * s$.

Das erhaltene Schnittmuster zeigt die gleichen Produkte in ähnlicher Verteilung für ein 5'-Thymin, 5'-Adenin und 5'-Cytosin des Leitstrangs. Im Falle des G-Leitstrangs reduzieren

sich die Hauptprodukte auf die zwei kleinsten Hauptprodukte, die zuvor für den T-Leitstrang gefunden wurden. Auch die Geschwindigkeit der Degradation unter Führung des G-Leitstrangs im Vergleich zum T-Leitstrang ist erhöht (Abb. 4.3-2).

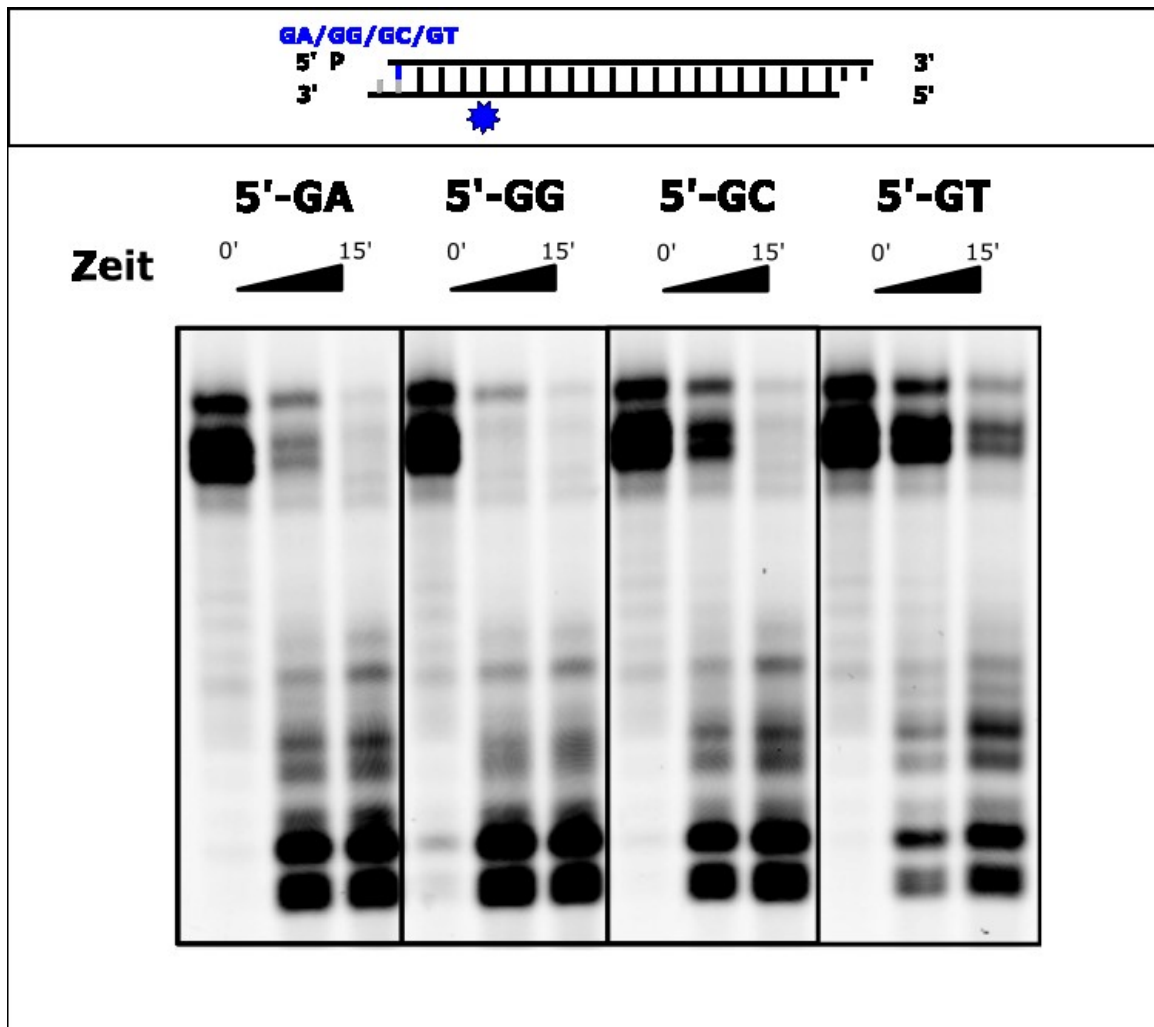


Abb. 4.3-3. Einfluss des zweiten Nukleotids. 666 nm p17-AF-Zielstrang und 333 nm des jeweiligen G-Leitstrangs (zweites Nukleotid ausgetauscht, markiert in blau) wurden zusammen mit 3 μ M MjAgo für die angegebene Zeit inkubiert und über denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Anschließend wurde die Fluoreszenzmarkierung des Zielstrangs (Alexa647 an Position 17, blauer Stern) detektiert. Jeder verwendete Leitstrang führt zu einer anderen Degradationsgeschwindigkeit, wobei der GG-Leitstrang zur höchsten Degradationsgeschwindigkeit führt, der GT-Leitstrang zur geringsten. Der Anteil der entstehenden Nebenprodukte korreliert mit der Reaktionsgeschwindigkeit, sodass die höchste Reaktionsgeschwindigkeit den geringsten Anteil an Nebenprodukten erzeugt.

Die Prozessierung unter Nutzung des G-Leitstrangs zeigt eine geringere Anzahl an Schnittprodukten mit gleichzeitig erhöhter Abbaugeschwindigkeit. Der Vergleich der

Umsatzraten zeigt eine um 65% erhöhte Umsatzgeschwindigkeit für den G-Leitstrang gegenüber dem T-Leitstrang (0,2 und 0,13 $\text{nmol}_{DNA}/\mu\text{mol}_{protein} * s$ für G- und T-Leitstrang).

Der Einfluss des zweiten Nukleotids auf die Produktverteilung ist geringer, die Veränderung der Reaktionsgeschwindigkeit ist allerdings sehr deutlich sichtbar. Dazu wurde das zweite Nukleotid, gezählt vom 5'-Ende, des G-Leitstrang in den Aktivitätsassays variiert (Abb. 4.3-3).

Der Aktivitätsassay zeigt, dass ein GT-Leitstrang zu einem vergleichbaren Schnittmuster mit ähnlicher Abbaugeschwindigkeit wie ein T-Leitstrang führt, ein GG-Leitstrang allerdings Spezifität und Reaktionsgeschwindigkeit deutlich erhöht. Auch hier ist anzumerken, dass eine effektive Prozessierung des Zielstrangs trotzdem für alle verwendeten Leitstränge sichtbar ist. Die Bevorzugung einer bestimmten Sequenz lässt allerdings auch die Spekulation zu, ob ein potentiell vorgeschalteter Prozess Leitstränge für MjAgo bereit stellt, welche präferentiell ein Guanin-Guanin-5'-Ende aufweisen.

4.4. Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Phosphate

Nachdem ein starker Einfluss des ersten und zweiten Nukleotids auf das Prozessierungsverhalten MjAgos sowie die konformationellen Zustände des ternären Komplexes beobachtet werden konnte, sollte nun untersucht werden, ob ein phosphorylierter Zielstrang die Zuordnung von Leitstrang und Zielstrang erschwert oder sogar umkehrt, sofern der Leitstrang kein entsprechendes Phosphat aufweist. Dazu wurden Aktivitätsassays mit denaturierender Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese verwendet (Abb. 4.4-1).

Eine Phosphatgruppe am Zielstrang führt zu einer Reduktion der Schnittstellen auf die Hälfte sowohl bei Verwendung eines Guanin- als auch eines Thymin-Leitstrangs, gleichzeitig werden zwei weitere Schnittstellen näher am 3'-Ende des Zielstrangs verwendet. Die Abbaugeschwindigkeit ist annähernd unbeeinflusst, sofern der Leitstrang ein 5'-Phosphat aufweist. Es ist bemerkenswert, dass sowohl Hydroxyl- als auch Phosphatterminale Leit- und Zielstränge verarbeitet werden können, wenn auch mit erheblichem Unterschied der Abbaugeschwindigkeiten.

4.5. Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Länge der Nukleinsäuren, Überhänge und Abbaurichtung

In Ermangelung der Kenntnis um endogene Leitstrang-Zielstrang-Konstrukte von MjAgo wurde bisher ein Konstrukt verwendet, welches einen Leitstrang mit 21 Nukleotiden Länge und 5'-Phosphatgruppe aufweist. Da die endogene Quelle der Leitstränge weiterhin unbekannt war, wurde das Spektrum der Leitstrang-Länge untersucht, in dem MjAgo katalytisch aktiv ist. Dazu wurden DNA-Konstrukte einer Länge von 13 bis 41 Nukleotiden in Bezug auf ihre Nutzbarkeit als Leitstrang untersucht sowie das Prozessierungsverhalten bei Nutzung eines Zielstrangs mit 41 Nukleotiden betrachtet (Abb. 4.5-1).

Die Mindestlänge des Leitstrangs beträgt 15 Nukleotide, es wurde keine Obergrenze gefunden. Das Schnittmuster für eine Länge des Leitstrangs von 19 bis 23 Nukleotiden ist vergleichbar mit dem für den bisher verwendeten T-Leitstrang. Im Falle der 15 bzw. 17 Nukleotid-Leitstränge entstehen zwei Hauptprodukte, für die 41 Nukleotid-Leitstränge ein Hauptprodukt. Es muss also von einer instabileren Positionierung des verwendeten Konstrukts ausgegangen werden, sobald die Länge von 17 Nukleotiden überschritten wird. Gleichzeitig ist ein anderer Prozessierungsmodus für sehr lange Leitstränge denkbar, da sich sowohl das Schnittmuster als auch die Abbaugeschwindigkeit bei Verwendung von langer, doppelsträngiger DNA grundlegend ändert. Das Konstrukt aus einem Leitstrang mit 41 Nukleotiden und einem Zielstrang mit 20 Nukleotiden wird, wenn auch äußerst langsam, ebenfalls degradiert. Eine kanonische Bindung des Leitstrangs mit Positionierung des Zielstrangs in ausreichender Nähe zum aktiven Zentrum ist in diesem Fall nicht möglich. Auch die Verwendung des Zielstrangs als Leitstrang ermöglicht keine

Prozessierung der kurzen DNA, da auch nach einer Prozessierung des 41-Nukleotid-Zielstrangs kein entsprechender Leitstrang entsteht.

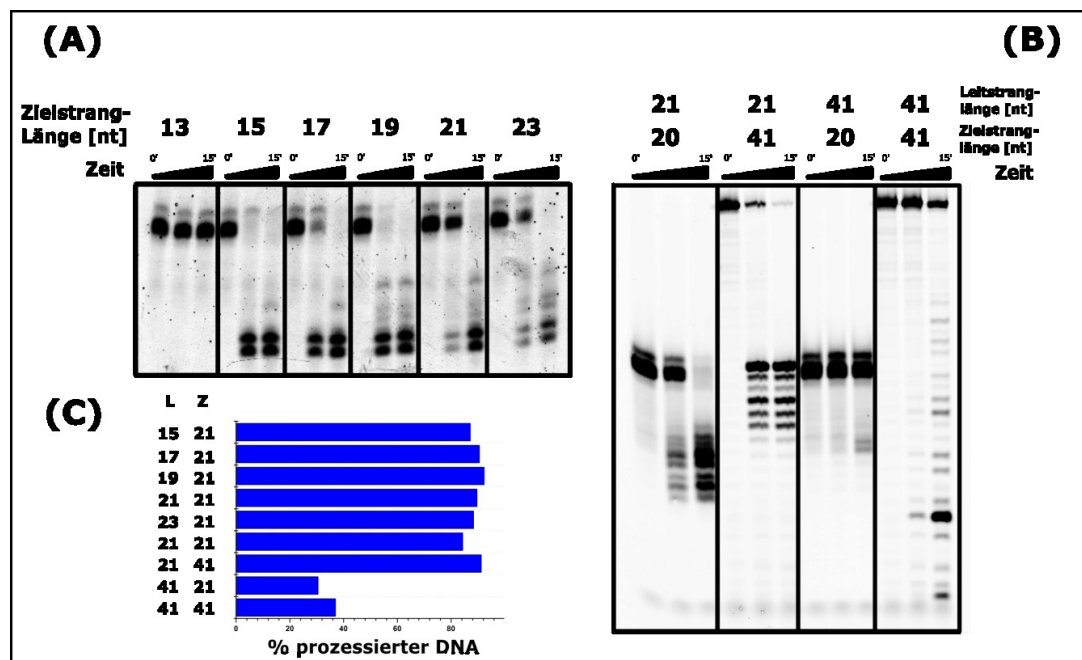


Abb. 4.5-1. Unterschiedliche Leitstrang-Längen. Es wurden 3 μ M MjAgo mit je 500 nM Leitstrang und 1 μ M Zielstrang bei 85°C für 0, 7,5 und 15 Minuten inkubiert und die Produkte anschließend über denaturierende 15%ige Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese getrennt. Die Detektion der Fluoreszenzmarkierung des p17-AF-Zielstrangs (Alexa647 an Position 17) bzw. des 41 nt-5'AF-Zielstrangs (Alexa647 am 5'-Terminus) erfolgte mittels eines Fluoreszenzscanners. Alle Leitstränge einer Länge von 13 bis 23 Nukleotiden wiesen eine 5'-Phosphatgruppe auf, die 41-Nukleotid-Leitstränge einen 5'-Hydroxylterminus. (A) Leitstrang-Länge von 13 bis 23 Nukleotiden, Zielstrang-Länge 21 Nukleotide. Schnittaktivität kann ab einer Leitstrang-Länge von 15 Nukleotiden beobachtet werden, dabei entstehen zwei Hauptprodukte einer Länge von 9 und 10 Nukleotiden bei Verwendung eines 15 und 17 Nukleotid langen Leitstrangs, für 19 bis 23 Nukleotid lange Leitstränge entsteht das für den T-Leitstrang kanonische Muster. Bemerkenswert ist die erhöhte Abbaugeschwindigkeit für die 15 und 19 Nukleotid-Leitstränge im Verhältnis zu den anderen Konstrukten. (B) Leitstrang-Länge 21 und 41 Nukleotide, Zielstrang-Länge 21 und 41 Nukleotide. Die Abbaugeschwindigkeit im Falle des 41 Nukleotid-Leitstrangs ist deutlich herabgesetzt im Vergleich zu dem kanonischen Konstrukt. Der 41 nt-5'AF-Zielstrang wird dabei mit dem 21 Nukleotid-Leitstrang zu fünf Hauptprodukten mit einer Länge von 16 bis 21 Nukleotiden abgebaut. Es entsteht ein bemerkenswertes Hauptabbauprodukt des 41 nt-5'AF-Zielstrang von 10 Nukleotiden bei Verwendung eines 41-Nukleotid-Leitstrangs mit mehreren Nebenprodukten zwischen 11 und 30 Nukleotiden. Die Prozessierung des p17-AF-Zielstrangs findet nur in sehr geringem Maße statt. (C) Vergleich der Prozessierung der Zielstränge durch MjAgo. L: Leitstrang. Z: Zielstrang. Angabe als prozentual abgebaute DNA nach 15 Minuten Inkubation mit MjAgo. Auffällig ist die bedeutend ineffektivere Prozessierung bei Verwendung eines 41-Nukleotid-Leitstrangs.

Der Abbau des doppelsträngigen 41 Nukleotid-Konstrukts verläuft in bemerkenswerter Weise, da dort der Abbau präferenziell am 5'-Ende des Zielstrangs stattfindet, erkennbar am entstehenden Produktmuster mit einem Hauptprodukt von 10 Nukleotiden.

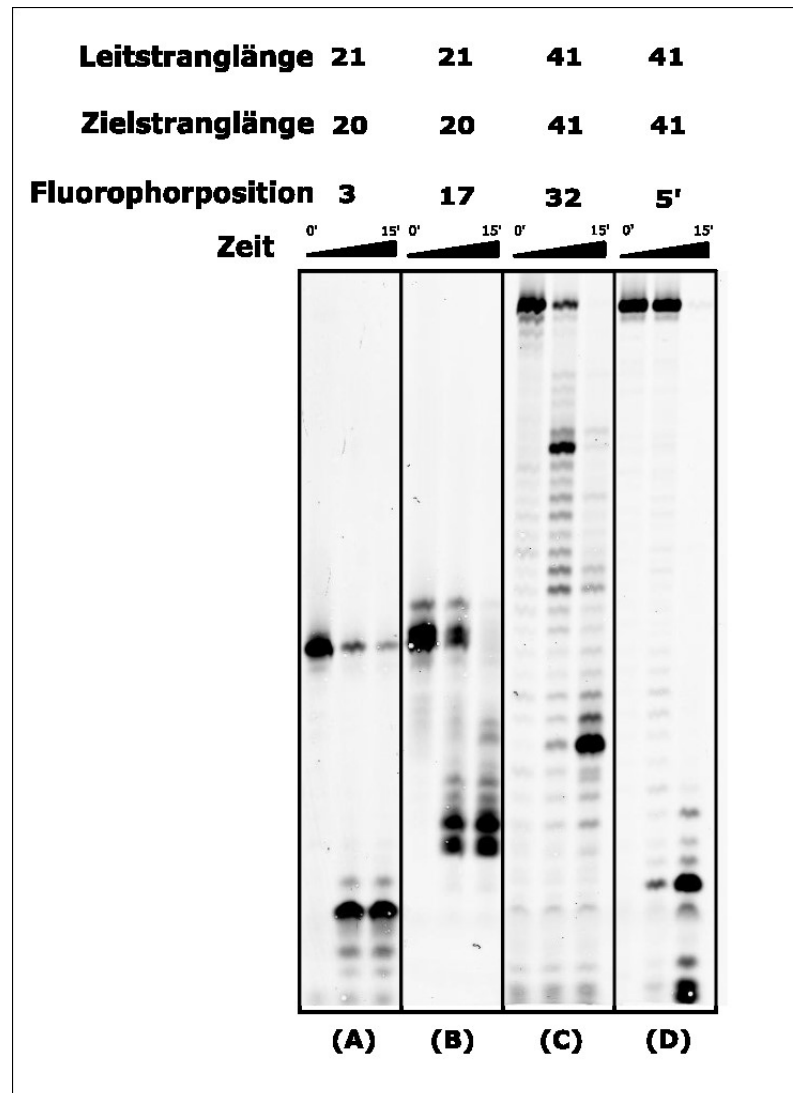


Abb. 4.5-2. Bevorzugte Seite des Abbaus. 3 μ M MjAgo wurden mit je 500 nM Leitstrang und 1 μ M Zielstrang bei 85°C für 0, 7,5 und 15 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Separation der Produkte über denaturierende 15%ige Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese mit nachfolgender Detektion der Fluoreszenzmarkierung des Zielstrangs (Alexa647). Es befand sich eine Phosphatgruppe am 5'-Ende des 21-Nukleotid-Leitstrangs, die 41-Nukleotid-Leitstränge wiesen einen 5'-Hydroxylterminus auf. A: Der Farbstoff Alexa647 befindet sich an Position 3 des p3-AF-Zielstrangs. Es wird ein Hauptprodukt einer Länge von 10 Nukleotiden gefunden. B: Alexa647 befindet sich an Position 17 des p17-AF-Zielstrangs. Es werden zwei Hauptprodukte mit 12 bzw. 13 Nukleotiden Länge gefunden. C: Der Farbstoff Alexa647 befindet sich an Position 32 des 41 nt-p37-Zielstrangs. Nach 7,5 Minuten wird ein Hauptprodukt von 31 Nukleotiden Länge gefunden, nach 15 Minuten ist dieses Produkt nur noch in sehr geringer Konzentration auffindbar. Das Hauptprodukt zu diesem Zeitpunkt weist eine Größe von 16 Nukleotiden auf. D: Am 5'-Ende des 41 nt-5'-AF-Zielstrangs befindet sich der Farbstoff Alexa647. Nach 15 Minuten führt die Reaktion zu einem Hauptprodukt

einer Länge von 11 Nukleotiden. Nach 7,5 Minuten ist kein anderes Produkt erkennbar, sondern nur das 11-Nukleotid-Produkt.

Dies deutet auf eine Prozessierung von Konstrukten hin, die für einen kanonischen Einbau des Leitstrangs in MjAgo zu lang sind. Gleichzeitig wird ein Ende des Zielstrangs für den Abbau bevorzugt (Abb. 4.5-2).

MjAgo bevorzugt das 5'-Ende eines Zielstrangs einer Länge von 41 Nukleotiden für den katalytischen Prozess, erkennbar am einzelnen Reaktionsprodukt bei Verwendung einer Markierung am 5'-Ende. Positionierung des Farbstoffs in der Nähe des 3'-Endes des Zielstrangs zeigt zunächst die Abspaltung eines kurzen Bereichs der DNA (Abspaltung von 10 Nukleotiden) mit nachfolgender Degradation der übrigen DNA auf ein 16-Nukleotid-Produkt. Gleichzeitig entstehen mehrere Nebenprodukte, die entweder für einen Schnitt innerhalb des Konstrukts oder durch sequenziellen Fortsatz des begonnenen Abbaus sprechen. Da das Hauptprodukt im Reaktionsverlauf von 31 Nukleotiden auf 16 Nukleotide Länge abgebaut wird, erscheint der sequenzielle Abbau wahrscheinlich. Die Fortsetzung des Abbaus erzwingt einen anderen Modus der Bindung des zu verarbeitenden Konstrukts, da eine Verankerung des 5'-Endes des Leitstrangs innerhalb MjAgos die Positionierung des Zielstrangs im katalytischen Zentrum nicht ermöglichen würde. Es sind also zwei Modi für die Prozessierung von DNA durch MjAgo nötig. Alternativ wäre ein Mechanismus denkbar, in dem MjAgo zuerst einen Strang prozessiert und den prozessierten Strang nachfolgend als Leitstrang verwendet. Durch Repetition dieses Prozesses ist eine Degradation von beiden Strängen möglich.

Die für das humane Argonaute2 benötigten und bisher verwendeten Überhänge der Leitstränge gegenüber des Zielstrangs waren im Falle der 41 Nukleotid-Konstrukte nicht gegeben, trotzdem konnte Aktivität beobachtet werden. Die Überhänge wurden deshalb schrittweise entfernt und die Aktivität beobachtet (Abb. 4.5-3).

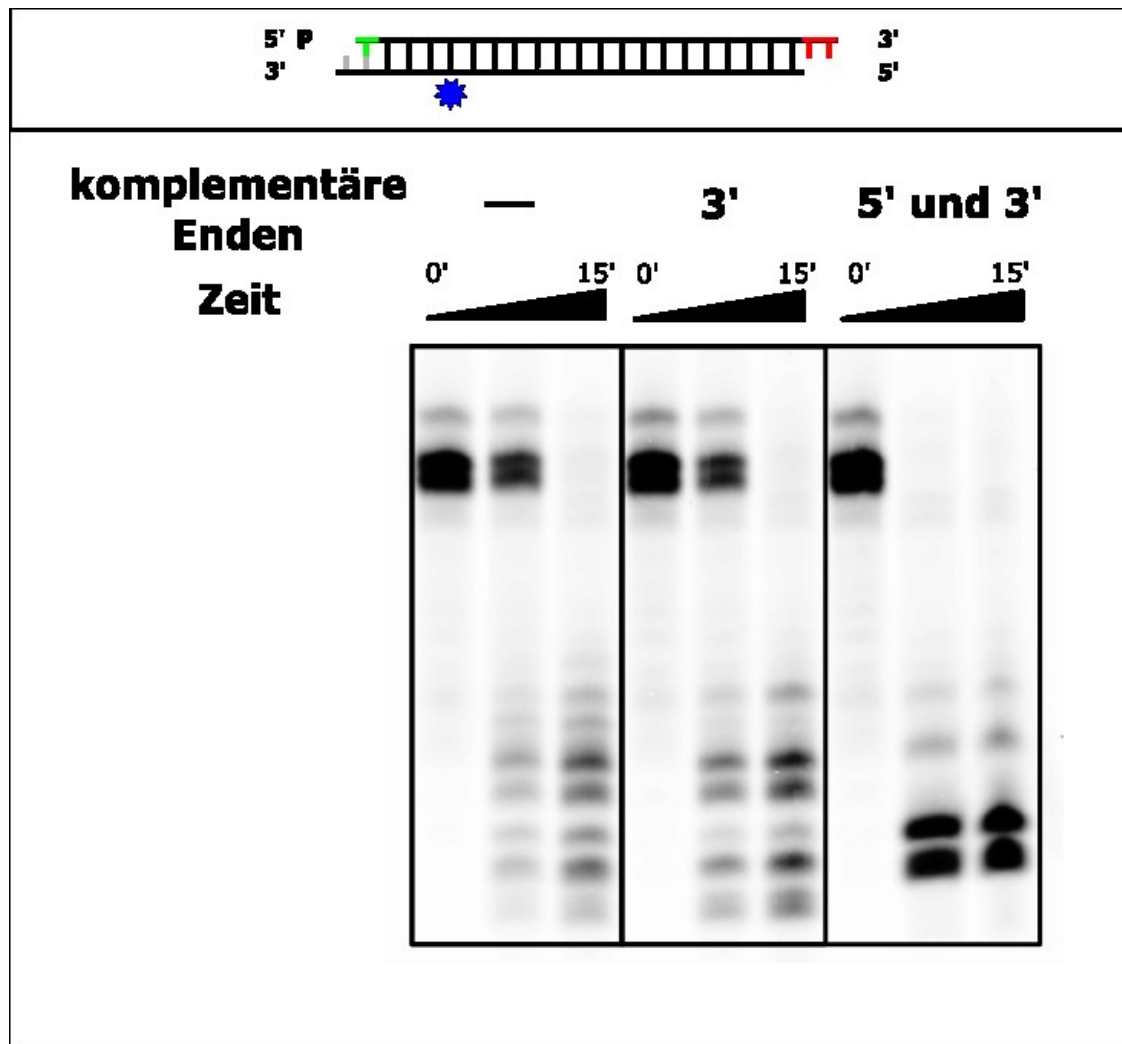


Abb. 4.5-3. Einfluss der Überhänge. Es wurden 500 nM Leitstrang und 1 μ M Zielstrang zusammen mit 3 μ M MjAgo auf 85°C erhitzt und die Produkte anschließend über 15%ige denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese getrennt mit nachfolgender Detektion des Fluoreszenzsignals des p17-AF-Zielstrangs (Alexa647 an Position 17, blauer Stern). Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 7,5 und 15 Minuten. Im Konstruktschema ist der entfernte 3'-Überhang in rot markiert, der entfernte 5'-Überhang in grün. Die Entfernung des 3'-Überhangs des Leitstrangs hat keinerlei Einfluss auf die Prozessierung. Eine vollständige Entfernung der Überhänge führt zu einer Erhöhung der Reaktionsgeschwindigkeit sowie einer Reduzierung der Produkte auf zwei Hauptprodukte. Dabei ist zu beachten, dass der verwendete Leitstrang 17 Nukleotide aufweist und somit das Schnittverhalten kongruent mit dem zuvor für einen Leitstrang entsprechender Länge beobachteten ist.

Die Überhänge des DNA-Konstrukts sind für die Prozessierung durch MjAgo nicht relevant. Es erfolgt keine Auswahl der Leitstränge durch einen speziellen Überhang. Potentiell vorgeschaltete Prozesse, die Leitstränge speziell für MjAgo bereitstellen könnten, können keine Spezifität durch einen Überhang erzielen.

Phosphate an Leitstrang oder Zielstrang verändern das Ergebnis der Prozessierung, sind allerdings nicht relevant für die Aktivität per se. Es wurde eine Mindestlänge für den Leitstrang gefunden, ab der eine Prozessierung stattfinden kann. Desweiteren wurde festgestellt, dass auch Konstrukte, die nicht kanonisch gebunden werden können, prozessiert werden, weshalb auf einen zweiten Bindungs- und Aktivitätsmodus geschlossen wurde.

Zusammengefasst konnte kein zwingendes Kriterium gefunden werden, dass eine spezielle DNA-Spezies exklusiv für MjAgo bereit gestellt wird, demnach ist auch keine Aussage über vorgeschaltete Prozesse möglich. Im Gegenteil kann vermutet werden, dass kein Mechanismus zur Generierung des Leitstrang existiert, da kein Grund gefunden wurde, einen solchen Mechanismus als notwendig anzusehen.

4.6. Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Änderung der vollständigen Sequenz

Zur Validierung der bisherigen Ergebnisse wurden ausgewählte Versuche ausgedehnt auf zwei weitere Sequenzen, as2b und siLuc. Diese sind nicht mit der bisher verwendeten let7-Sequenz verwandt und erlauben Rückschlüsse auf die Sequenzabhängigkeit der beobachteten Einflüsse. Es wurden jeweils ein Guanin- und Thymin-Leitstrang sowie ein Zielstrang mit 3'-Phosphat im Verhältnis zu einem 3'-Hydroxyl-Zielstrang untersucht (Abb. 4.6-1).

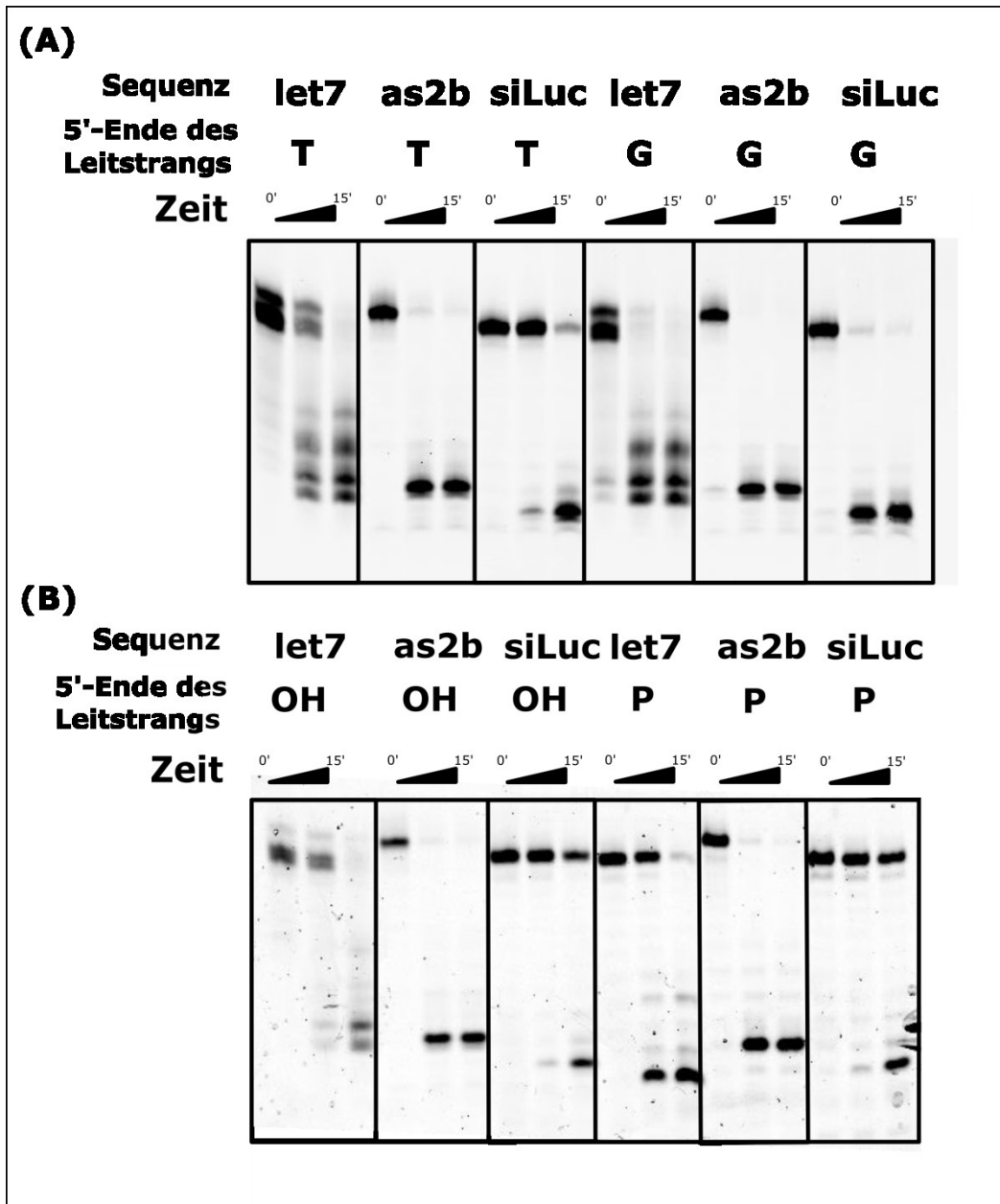


Abb. 4.6-1. Einfluss der Sequenz auf das Prozessierungsverhalten von MjAgo. Es wurden 3 μM MjAgo mit je 500 nM Leitstrang und 1 μM Zielstrang auf 85°C erhitzt. Die Probennahme erfolgte zu den Zeitpunkten 0, 7,5 und 15 Minuten. Die Auftrennung der Produkte erfolgte über denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese mit anschließender Detektion des Fluoreszenzsignals des Zielstrangs (p17-AF-Zielstrang mit Alexa647 an Position 17, as2b p18-AF-Zielstrang und siLuc Zielstrang mit Alexa647 an Position 18). Es wurde das erste Nukleotid des Leitstrangs entweder als Thymin oder Guanin gewählt, der Zielstrang ist für das jeweilige Konstrukt unverändert. (A) Vergleich von G- und T-Leitstrang. Der Einfluss des ersten Nukleotids des Leitstrangs auf das entstehende Schnittmuster ist nur für die let7-Sequenz erkennbar (zuvor besprochen). Im Falle von as2b und siLuc entsteht ein einzelnes Hauptprodukt für beide Leitstrang-Sequenzen, der Abbau erfolgt im Falle des G-Leitstrangs des siLuc-Konstrukts schneller als mit der Thymin-Variante. Das Hauptprodukt der Prozessierung des siLuc-Zielstrangs ist ein Nukleotid kürzer als das der as2b-Variante und damit ebenfalls kürzer als das kleinste Hauptprodukt der let7-Sequenz. (B) Vergleich

des Einflusses des 3'-Phosphats des Zielstrangs auf das Prozessierungsverhalten von MjAgo. Auch hier ist der Einfluss auf das entstehende Schnittmuster nur für das let7-Konstrukt erkennbar. Das für die as2b- sowie siLuc-Sequenz entstehende Hauptprodukt ist weder in Bezug auf die Anzahl und Größe der Produkte noch bezüglich der Reaktionsgeschwindigkeit beeinflusst von der 3'-Hydroxyl- bzw. Phosphat-Gruppe des Zielstrangs.

Der zuvor beobachtete Einfluss des ersten Nukleotids des Leitstrang sowie der 3'-Modifikation des Zielstrangs kann für andere Sequenzen nicht nachvollzogen werden. Sowohl as2B als auch siLuc zeigen nur ein einzelnes Hauptprodukt in allen Fällen, während let7 zwei (G-Leitstrang) oder fünf (T-Leitstrang) Hauptprodukte aufweist. Das Produkt des Abbaus des siLuc-Zielstrangs weist dabei eine Größe von 6 Nukleotiden auf und ist somit ein Nukleotid kürzer als das der as2b-Sequenz. Die verringerte Anzahl an Prozessierungsprodukten spricht für eine spezifischere Wechselwirkung von DNA und MjAgo und deutet damit auf eine stabilere Positionierung der DNA innerhalb der bindenden Domänen des Proteins hin. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist für die drei getesteten Sequenzen stark unterschiedlich mit einem Maximum für die as2b-Sequenz und einem Minimum für siLuc.

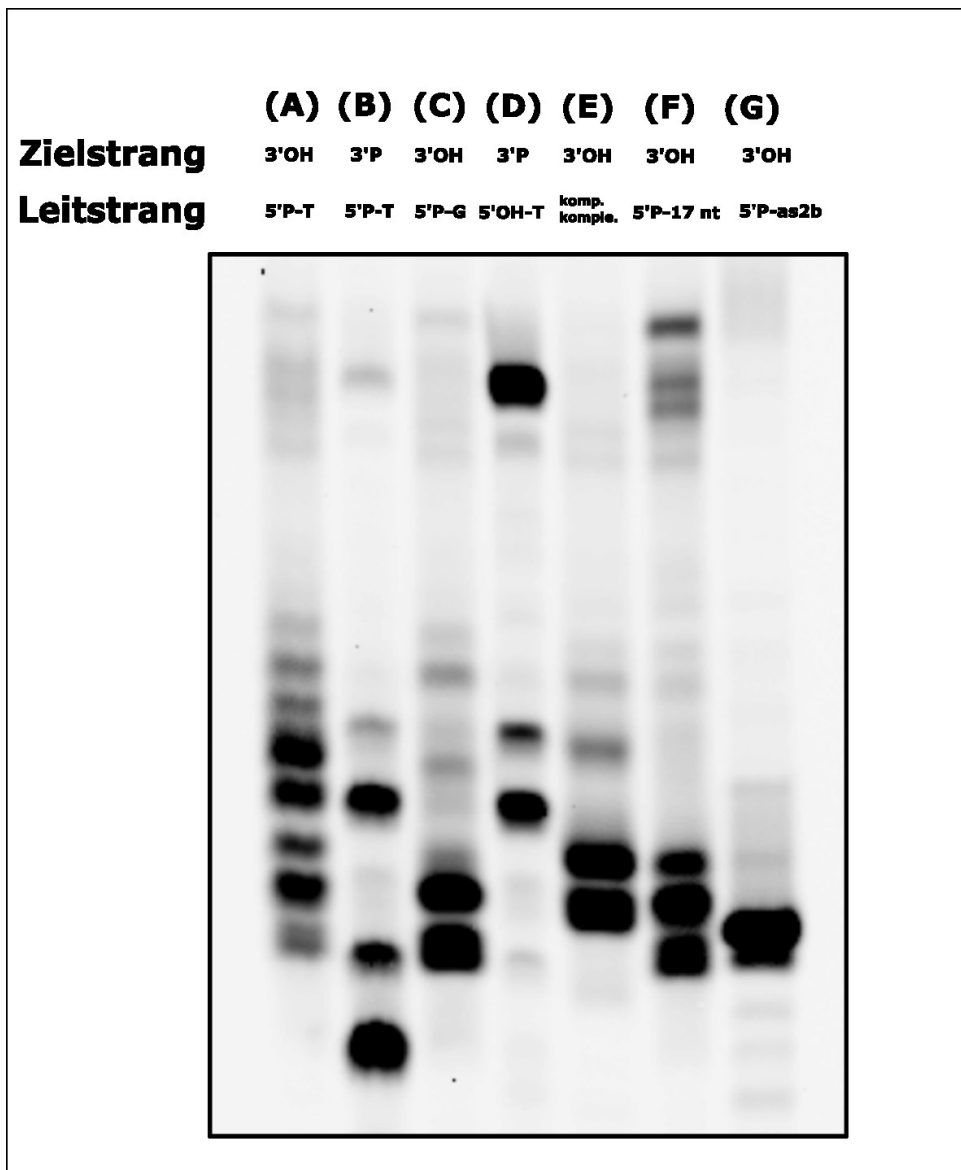


Abb. 4.6-2. Übersicht über den Einfluss der verschiedenen Modifikationen der DNA auf das Prozessierungsverhalten. Es wurden jeweils 3 μ M MjAgo mit 1 μ M Zielstrang und 500 nM Leitstrang für 15 Minuten bei 85°C inkubiert, die anschließende Auftrennung der Produkte erfolgte über denaturierende Harnstoffpolyacrylamidgelelektrophorese mit nachfolgender Detektion des Fluoreszenzsignals der Zielstrangs (Alexa647 an Position 17). (A) T-Leitstrang mit 5'-Phosphat und p17-AF-Zielstrang mit 3'-Hydroxyl-Gruppe. (B) T-Leitstrang mit 5'-Phosphat und Zielstrang-3'P mit 3'-Phosphat-Gruppe. (C) G-Leitstrang mit 5'-Phosphat und p17-AF-Zielstrang mit 3'-Hydroxyl-Gruppe. (D) Leitstrang-P mit 5'-Hydroxylgruppe und Zielstrang-3'P mit 3'-Phosphat-Gruppe. (E) T-Leitstrang mit 5'-Phosphatgruppe und vollständiger Komplementarität zum p17-AF-Zielstrang. (F) 17-nt-Leitstrang mit 5'-Phosphat und p17-AF-Zielstrang mit 3'-Hydroxyl-Gruppe. (G) T-Leitstrang mit 5'-Phosphat und as2b p18-AF-Zielstrang mit 3'-Hydroxyl-Gruppe.

4.7. Einfluss der Nukleinsäurezusammensetzung - Plasmide und genomische DNA

Es konnte keine obere Begrenzung für die Länge des Leitstrangs gefunden werden, allerdings wurde eine schwache katalytische Aktivität MjAgos auch dann gefunden, wenn aufgrund der vorhandenen Größe weder das 5'- noch das 3'-Ende kanonisch gebunden werden kann (vgl. Abbildung 4.7-1.). Auch alle anderen getesteten Modifikationen des Leitstrangs führten nicht zu einer katalytischen Inaktivität, trotz Beeinflussung der Prozessierung des Zielstrangs durch MjAgo.

Pulldown-Experimente zeigen an *Thermus thermophilus* Argonaute gebundene Fragmente plasmidaler DNA bei rekombinanter Expression in *E. coli*. Dies lässt auf eine *in vivo*-Aktivität dieses thermophilen Argonautes bei vergleichsweise geringen Temperaturen im Organismus schließen.⁴³ In vitro-Experimente konnten eine DNA-geführte Prozessierung von Plasmiden für *Thermus thermophilus* Argonaute und *Pyrococcus furiosus* Argonaute zeigen.¹⁰⁰ Dabei fand eine Linearisierung des Plasmids statt. Es wurde bisher nicht geklärt, aus welcher Quelle die *in vivo*-verwendeten Leitstränge stammen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten die Möglichkeit der direkten Prozessierung langer, doppelsträngiger DNA-Konstrukte durch MjAgo an. Weder Kofaktoren noch eine spezielle Komposition oder Struktur der Substrate waren für eine Aktivität notwendig, sodass die Versuche auf andere DNA-Formen ausgeweitet wurden. Dazu wurden sowohl plasmidale als auch genomische DNA mit MjAgo versetzt (Abb. 4.7-1).

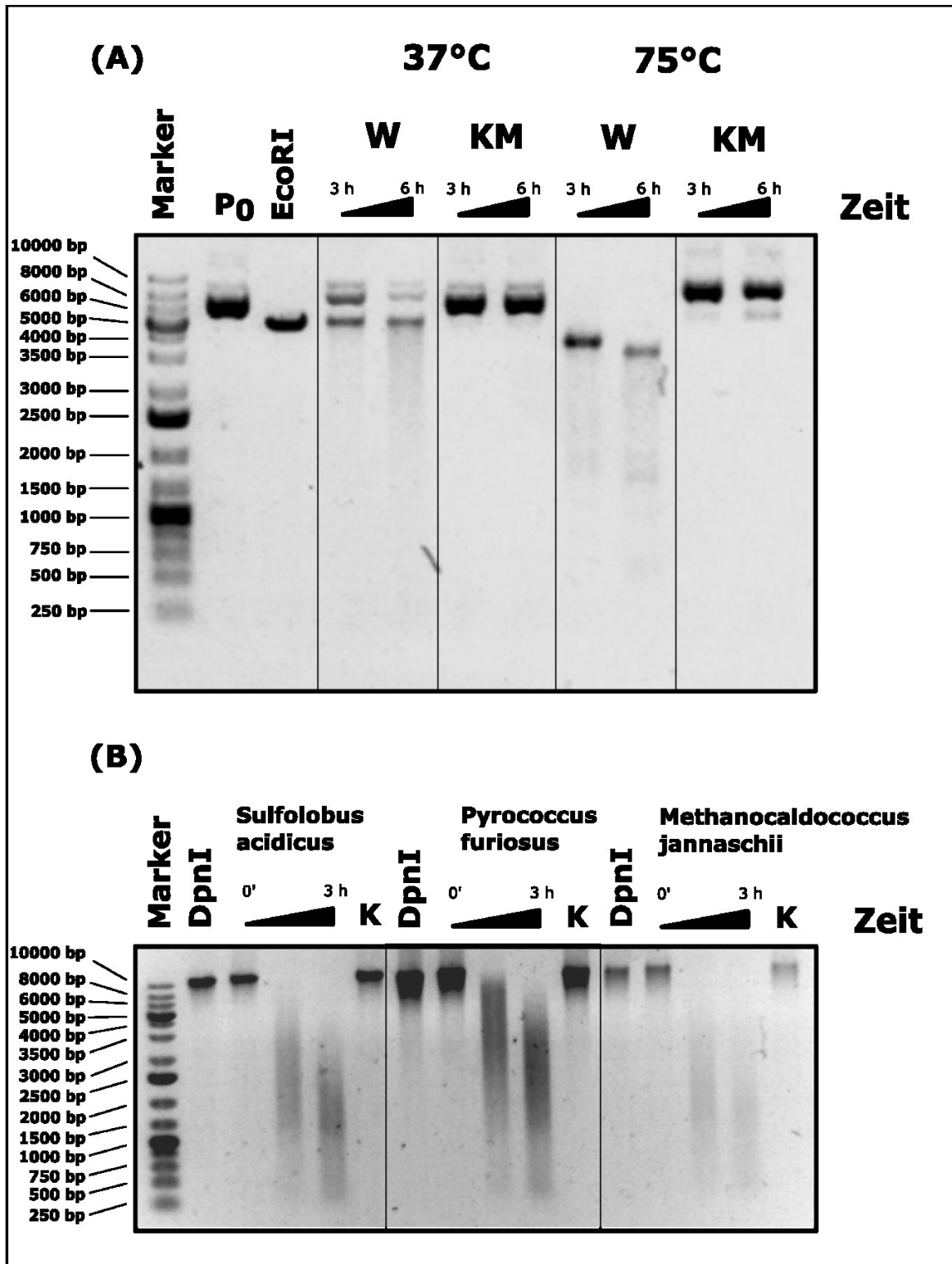


Abb. 4.7-1. Prozessierung von plasmidaler und genomischer DNA. Es wurden 400 ng Plasmid bzw. 300 ng genomische DNA mit 1 μ M MjAgo erhitzt und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Auftrennung der Produkte erfolgte über denaturierende Agarosegelelektrophorese mit nachfolgender Detektion des dem Gel zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffs SybrSafe. Es wurden keine weiteren Leitstränge zugegeben. Sowohl Plasmide als auch genomische DNA werden durch MjAgo prozessiert. Die Produkte sind über einen weiten Größenbereich verteilt und werden in Abhängigkeit von der Reaktionsdauer graduell in

einen kleineren Größenbereich verschoben. Bedingt durch die begrenzte Auflösung ergibt sich dadurch eine Akkumulation der Fragmente bei einer Größe von ca. 25 bp bei vollständigem Abbau. Die Kontrolle mit katalytisch inaktiver Mutante (KM) zeigt diesen Abbau nicht, sodass von einer spezifischen Degradation durch MjAgo ausgegangen wird. EcoRI bedeutet dabei eine Linearisierung des Plasmids durch die DNase EcoRI, DpnI durch das Restriktionsenzym DpnI. K stellt die DNA ohne Zugabe von MjAgo dar. (A) Probennahme nach 3 und 6 Stunden. Prozessierung des Plasmids pGEX-2TK bei 37°C und 75°C. Der Abbau des Plasmids kann mittels unmutiertem MjAgo (W) gezeigt werden, die unspezifische Degradation ist an der großen Verteilung der Abbauprodukte nach 6 Stunden erkennbar. (B) Probennahme nach 0, 3 und 6 Stunden. Prozessierung genomischer DNA aus den drei angegebenen Organismen bei 37°C. Auch hier unterliegen die Reaktionsprodukte einer ausgeprägten Größenverteilung.

MjAgo prozessiert sowohl plasmidale als auch genomische DNA ohne Zugabe von weiteren Leitsträngen. Es erfolgt zunächst die Linearisierung des Plasmids mit anschließendem graduellen Abbau. Dabei wird im Gel eine sehr große Verteilung der Reaktionsprodukte gefunden, welche mit zunehmender Reaktionszeit in den Bereich geringerer Molekulargewichte verschoben wird. Es wird ein Mechanismus des wechselseitigen Abbaus mit Vertauschung von Leit- und Zielstrang angenommen. Die Degradation genomischer DNA, auch von *Methanocaldococcus jannaschii*, erfolgt analog. Invasive, doppelsträngige DNA kann somit allein durch MjAgo abgebaut werden. Die Zugabe von EDTA zu der Reaktion verhindert jeglichen Abbau durch Komplexbildung der zweiwertigen Metallkationen, sodass die gleiche katalytische Tetrade wie im Falle des Leitstrang-gesteuerten Abbaus angenommen wird (Abb. 4.7-2). Zuvor wurde beobachtet, dass die Nukleaseaktivität von MjAgo ab einer Temperatur von 75°C einsetzt. Wenn auch langsam, ist der Abbau des Plasmids bei 37°C zu beobachten. Ab 85°C ist die Aktivität MjAgos deutlich erhöht. Dies zeigt einen alternativen Bindungsmodus an, welcher eine geringere Aktivierungsenergie für das Erreichen der aktiven Konformation voraussetzt.

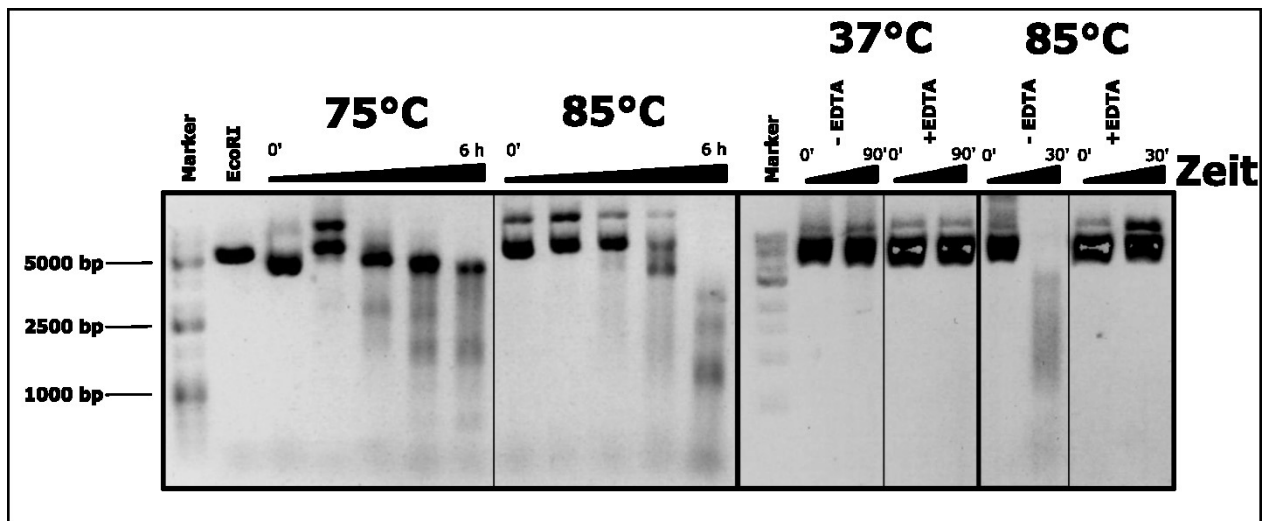


Abb. 4.7-2. Prozessierung plasmidaler DNA bei unterschiedlichen Temperaturen und unter Zusatz von EDTA. Es wurden je 400 ng Plasmid und 1 μ M MjAgo eingesetzt. Die Auftrennung der Produkte erfolgte über denaturierende Agarosegelelektrophorese mit nachfolgender Detektion des zum Gel zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffs SybrSafe. Zeitpunkte der Probennahme für 75°C: 0, 1, 2, 4, 6 Stunden, für 85°C (linke Seite): 0, 2, 5, 10, 30, 60 Minuten, für 37°C: 0 und 90 Minuten, für 85°C (rechte Seite): 0 und 30 Minuten. Der Abbau erfolgt bei 85°C schneller als bei 75°C. Durch Zugabe von EDTA wird die Prozessierung vollständig unterdrückt. EcorRI = Linearisierung des Plasmids durch das Enzym EcoRI.

Die Aktivität ist auch im Falle kurzer DNA-Konstrukte bei 85°C erheblich schneller als bei 75°C, bei 37°C wurde keine Degradation kurzer DNA beobachtet. Somit scheint der unspezifische Mechanismus der Prozessierung langkettiger DNA-Konstrukte andere, bei niedrigeren Temperaturen zugängliche Konformationen zu nutzen als der spezifische, Leitstrang-geführte Mechanismus.

Im Vergleich zu den bisher durchgeführten Leitstrang-vermittelten Reaktionen ist der Abbau von plasmidaler DNA langsam. Es wurde deshalb der Einfluss des Leitstrangs auf den Abbau durch MjAgo getestet (Abb. 4.7-3).

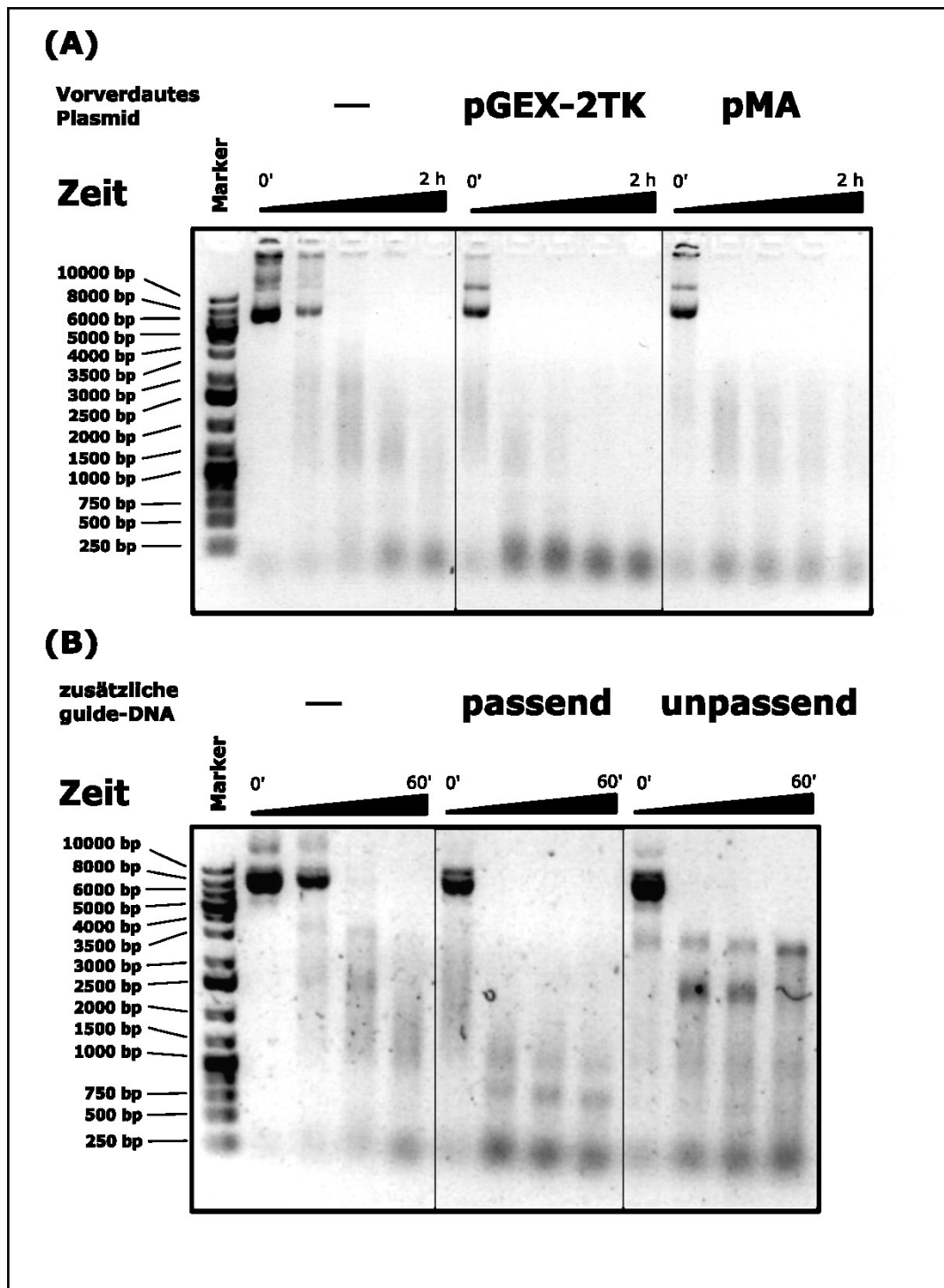


Abb. 4.7-3. Prozessierung plasmidaler DNA mit Einsatz von Leitsträngen. Es wurden je 400 ng Plasmid mit 1 μ M MjAgo bei den angegebenen Temperaturen für die genannte Zeit erhitzt. Die Produkte wurden mittels denaturierender Agarosegelelektrophorese getrennt mit nachfolgender Detektion des zum Gel zugesetzten Fluoreszenzfarbstoffs SybrSafe. (A) Plasmidprozessierung durch MjAgo nach Abbau eines Plasmids. Es wurden 100 ng Plasmid (pGEX-2TK) bei 85°C für 2 Stunden durch MjAgo prozessiert und nachfolgend entweder erneut das gleiche Plasmid oder ein sequenzfremdes Plasmid (pMA) zugegeben. Der Abbau wird beschleunigt, wenn zuvor das gleiche Plasmid abgebaut wurde. Die Prozessierung des Plasmids pMA findet

langsamer statt. (B) Einsatz von definierten Leitsträngen. Es wurden je 140 ng Leitstrang (T7-Leitstrang vorwärts, T7-Leitstrang rückwärts) zusätzlich in der Reaktion eingesetzt. Zusätzlich wurde die gleiche Menge kurzer DNA-Stränge eingesetzt, die anhand ihrer Sequenz nicht als Leitstrang fungieren können (T-Leitstrang, as2b-T-Leitstrang). Der Abbau wird im Falle unpassender Sequenzen verlangsamt, im anderen Falle beschleunigt.

Die Zugabe definierter Leitstränge beschleunigt den Abbau. Mit diesen kann ein initialer Schnitt stattfinden, welcher eine weitere Prozessierung durch Bildung eines freien DNA-Endes ermöglicht. Eine erhöhte Anzahl von verschiedenen Leitsträngen, welche die Produkte einer vorhergehenden Prozessierung des gleichen Plasmids durch MjAgo darstellen, beschleunigen den Abbau im erheblichen Maße. Dies stellt eine mögliche Quelle für endogene Leitstränge dar, welche die Verteidigungsmöglichkeiten gegen wiederholte Exposition von invasiver DNA, sowohl Fremdplasmide als auch viraler DNA, durch einen Selbstbeschleunigungsmechanismus erhöht. Demnach ist der zweite beobachtbare Aktivitätsmodus von MjAgo die Fähigkeit des Proteins, durch einen langsamen und unspezifischen Prozess eigene Leitstränge für einen schnellen und spezifischen Modus bereitzustellen. Bei einer hohen Last an schnell mutierenden Viren stellt dieses System zum einen eine Möglichkeit dar, unabhängig von mutierbaren Restriktionsstellen sowie maskierter Erkennungssequenzen des R-M-Systems invasive DNA neutralisieren zu können. Zum anderen liefert das System eine schneller werdende Immunantwort, wenn die Zelle einer hohen Zahl gleicher Viren in kurzer Zeit exponiert ist.

Eine konstitutive, endogene Expression ist für einen Verteidigungsmechanismus notwendig, sofern dieser, wie hier anzunehmen, ohne weitere, vorlaufende Prozesse stattfindet. Dies konnte mittels Western Blot gezeigt werden. (Abb. 4.7-4) Es konnte endogenes MjAgo aus Zellen nachgewiesen werden, die keine bekannte Infektion aufweisen, sodass von einer konstitutiven Expression ausgegangen werden kann.

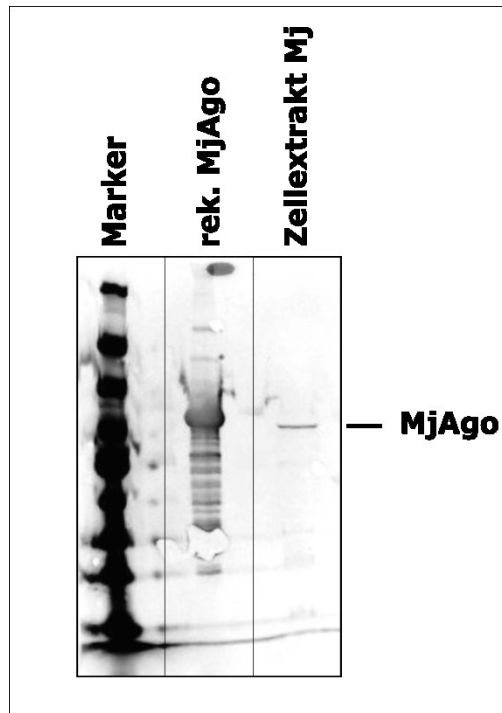


Abb. 4.7-4. Immunoblot von MjAgo. Es wurden 2 g Mj-Zellmasse eingesetzt und ein monoklonaler Maus-anti-MjAgo-Primärantikörper (Antibodyfacility, Braunschweig) sowie ein Alexa647-markierter Ziege-anti-Maus-Sekundärantikörper verwendet. Die Detektion von endogenem MjAgo ist positiv. Weitere, für das rekombinante MjAgo gefundene Banden sind Degradationsprodukte, die durch die Sensitivität des WesternBlots sichtbar werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass MjAgo zwei Aktivitätsmodi aufweist. Diese umfassen zum einen einen temperaturinduzierbaren, DNA-geführten Aktivitätsmodus, der spezifisch Zielstränge komplementär zum Leitstrang schneidet. Dessen Aktivität hängt stark von der verwendeten Sequenz der Leitstränge und der Beschaffenheit beider Stränge ab. Zum anderen existiert ein unspezifischer, nicht-geführter Aktivitätsmodus, welcher eine nachweisbare Aktivität auch bei geringeren Temperaturen aufweist und dem Protein die Möglichkeit verleiht, langkettige doppelsträngige DNA zu prozessieren.



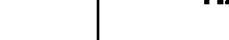
Darüberhinaus konnten verschiedene, stabile Zustände für das unbeladene Protein, den binären und ternären Komplex gefunden werden.

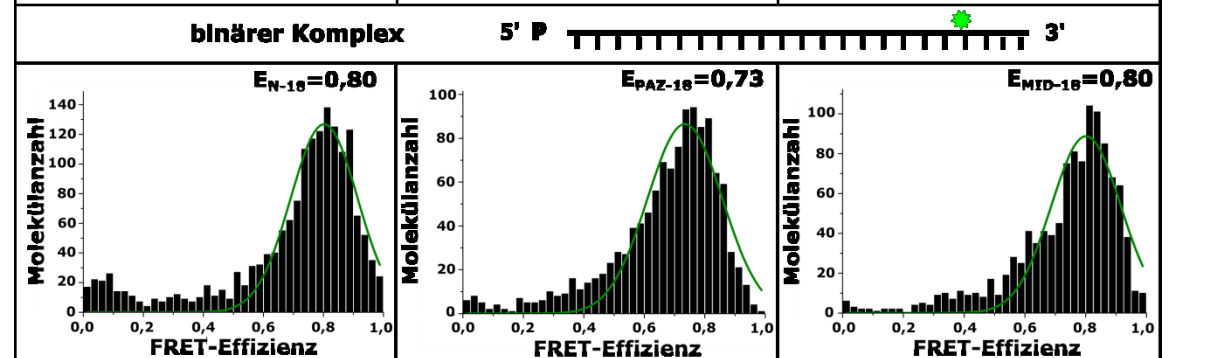
4.8. Restrukturierung bei DNA-Bindung

Die erforderliche Aktivierungsenergie zur Bindung der DNA zeigt einen notwendigen Konformationswechsel des Proteins an. Dieser sollte in Hinblick auf die Veränderung des Domänenarrangements bei Bindung eines DNA-Einzelstrangs sowie eines Doppelstrangs anhand von FRET-Messungen mit zwei Fluoreszenzfarbstoffen, gekoppelt an DNA und Protein, aufgeklärt werden. Dazu wurde der Akzeptorfarbstoff mit einer Phosphingruppe durch die Staudinger-Bertozzi-Ligation an die Azidgruppe der im Protein befindlichen unnatürlichen Aminosäure p-Azido-L-phenylalanin gebunden, der Donorfluorophor befand sich am Leitstrang, ausgehend vom 5'-Ende entweder an Position 13 oder 18. Donor- und Akzeptorfarbstoff wurden alternierend angeregt und die Fluoreszenz separat detektiert. Die Alternierung erlaubte die Aufstellung eines FRET-Effizienz-Stöchiometrie-Histogramms (E-S-Histogramm). Anschließende Filterung der Messwerte anhand von Verteilungsfunktionen erlaubte die Detektion von separaten FRET-Populationen. Eine weitere Auswertung der Daten konnte zeigen, dass während der Messung nur geringe Dynamik innerhalb der jeweiligen Population auftrat.

Bindungsexperimente zeigten die geringste Beeinflussung durch einen Farbstoff am Leitstrang bei Kopplung an Position 18. Darauf aufbauend wurde für die Bildung des binären Komplexes aus MjAgo und Leitstrang auch an dieser Stelle die Markierung genutzt. Es wurde der Donorfarbstoff Atto550 am Leitstrang sowie der Akzeptorfarbstoff DyLight650 an der jeweiligen Position im Protein verwendet. Der ternäre Komplex enthielt zusätzlich einen Zielstrang ohne weiteren Fluorophor (Abb. 4.8-1).

Es wird eine einzelne FRET-Population für alle binären Komplexe (bin) gefunden mit mittleren E-Werten von $E_{\text{bin N-18}} = 0,80 \pm 0,006$, $E_{\text{bin PAZ-18}} = 0,73 \pm 0,06$ und $E_{\text{bin MID-18}} = 0,80 \pm 0,07$. Die Formierung des ternären Komplexes (te) führte zur Bildung einer zweiten, deutlich abgetrennten FRET-Population. Dabei weist die FRET-Population mit hohem mittleren E-Wert Werte ähnlich den für den binären Komplex gefundenen auf ($E_{\text{te N-18}} = 0,80 \pm 0,02$, $E_{\text{te PAZ-18}} = 0,78 \pm 0,03$ und $E_{\text{te MID-18}} = 0,84 \pm 0,01$). Die neu entstandene Population (TF = tieferer FRET-Effizienzwert) zeigt geringere Werte ($E_{\text{te TF N-18}} = 0,63 \pm 0,16$, $E_{\text{teTF PAZ-18}} = 0,35 \pm 0,03$ und $E_{\text{teTF MID-18}} = 0,42 \pm 0,02$). Der geringste Unterschied der FRET-Effizienzen wird für das FRET-Paar mit Akzeptorfluorophor an der N-terminalen Domäne gefunden, die anderen beiden Konstrukte zeigen große Änderungen der FRET-Effizienz und damit auch des Abstands der Farbstoffe zueinander. Da aufgrund der bei der Komplexbildung gewählten Temperaturen keine Prozessierung durch MjAgo auftritt,

N-terminale Domäne	PAZ-Domäne	MID-Domäne
		



Wie bereits in den Bindungsstudien zuvor gesehen wurde, findet keine absolute Absättigung des Proteins mit doppelsträngiger DNA statt, sodass die Population mit hohem E-Wert aus der Konformation des binären Komplexes resultiert. Der geringe Abstand zu den drei Domänen zeigt die Verankerung des 3'-Endes der DNA in der PAZ-Domäne im

binären Komplex, die Entlassung der DNA aus der PAZ-Domäne führt zu einer Erhöhung des Abstands und damit zu einer Senkung des E-Wertes. Die Bildung des ternären Komplexes bewirkt eine große Änderung des konformationellen Zustands von MjAgo. Dabei tritt eine Entfernung des Leitstrangs sowohl von der PAZ- als auch der MID-Domäne im Vergleich zum geringen Abstand im binären Komplex auf, während der Abstand zur N-terminalen Domäne nur geringfügig erhöht wird. Dies schließt aus, dass das 3'-Ende des Leitstrangs im ternären Komplex weiterhin in der PAZ-Domäne verankert ist.

Zur genaueren Auflösung der DNA-Konformation wurde eine weitere Messung mit Verschiebung des Donorfluorophors an Position 13 des Leitstrangs durchgeführt (Abb. 4.8-2). Durch die Nähe zur fest gebundenen Seed-Region ist diese Farbstoffposition weniger stark in konformationelle Restrukturierungen der DNA involviert und dient somit als geeigneter Reporter für die Bewegungen der einzelnen Proteindomänen.

Der Übergang vom binären zum ternären Komplex fügt auch in diesem Fall eine zweite Population mit geringerem E-Wert hinzu. Dabei ist der Unterschied zwischen den beiden Populationen erwartungsgemäß geringer ($E_{te\ PAZ-13} = 0,80 \pm 0,04$, $E_{te\ TF\ PAZ-13} = 0,63 \pm 0,06$ und $E_{te\ MID-13} = 0,88 \pm 0,005$, $E_{te\ TF\ MID-13} = 0,67 \pm 0,09$ sowie $E_{bin\ PAZ-13} = 0,76 \pm 0,01$ und $E_{bin\ MID-13} = 0,81 \pm 0,005$). Während sich die Entfernung zur MID-Domäne nur geringfügig ändert, ist der entstehende Abstand zur PAZ-Domäne größer.

Somit lässt sich feststellen, dass die PAZ-Domäne, im Einklang mit Kristallstrukturen und *in silico*-Ergebnissen,^{16,17,31,32,39} eine hohe Flexibilität aufweist und entscheidenden konformationellen Änderungen unterliegt. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das 3'-Ende des Leitstrangs während der Bildung des ternären Komplexes aus der Verankerung in der PAZ-Bindetasche gelöst und der Leitstrang sodann gestreckt wird. Diese Bewegung verläuft stärker in Richtung des 3'-Endes des Leitstrangs, sodass der mittlere Bereich und damit der Fluorophor weiterhin in der Nähe der MID-Domäne residieren, wodurch der FRET-Wert nur sehr geringen Änderungen unterliegt.

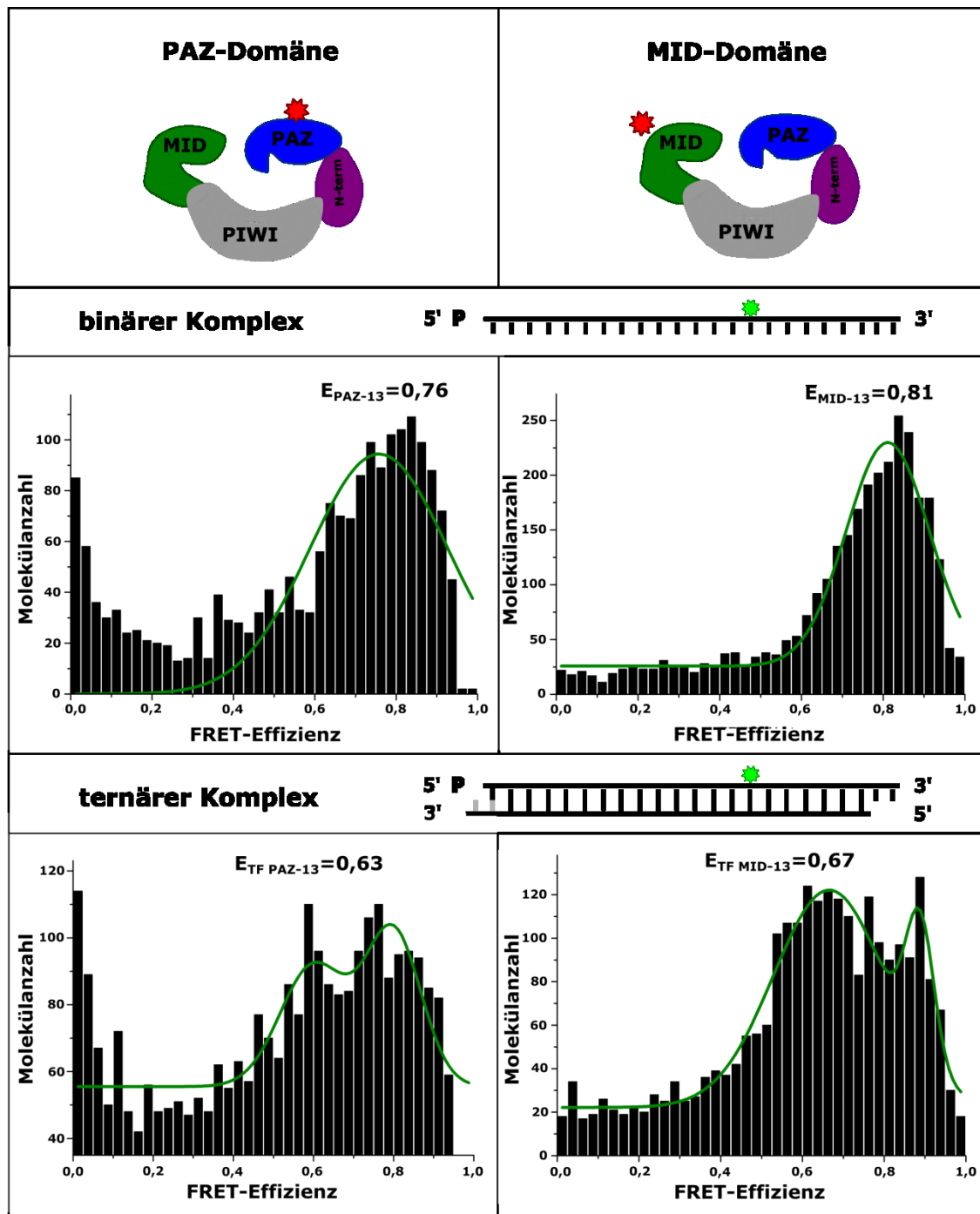


Abb. 4.8-2. Positionierung des mittleren Bereiches des Leitstrangs. Konformationelle Änderungen zwischen Position 13 des Leitstrangs und den Domänen MjAgos beim Übergang vom binären zum ternären Komplex. Der Donorfarbstoff Atto550 befand sich am p13AT-Leitstrang (grüner Stern im Konstruktschema), der Akzeptorfluorophor DyLight650 (roter Stern im Proteinschema) wurde an der jeweiligen Position im Protein an die unnatürliche Aminosäure gekoppelt. Es befand sich eine 5'-Phosphatgruppe am Leitstrang. Die mittleren FRET-Effizienzwerte wurden mittels einfacher oder doppelter Gauss-Regressionskurven ermittelt. Die Filter FRET-2CDE und ALEX-2CDE wurden auf alle Messdaten angewandt.

Die Anwendung des FRET-2CDE-Filters lässt desweiteren eine Aussage über die konformationelle Stabilität des Moleküls während des Passierens des konfokalen Anregungsvolumens zu, indem die Stabilität des erhaltenen FRET-Wertes über die Zeit analysiert wird (Abb.4.8-3).

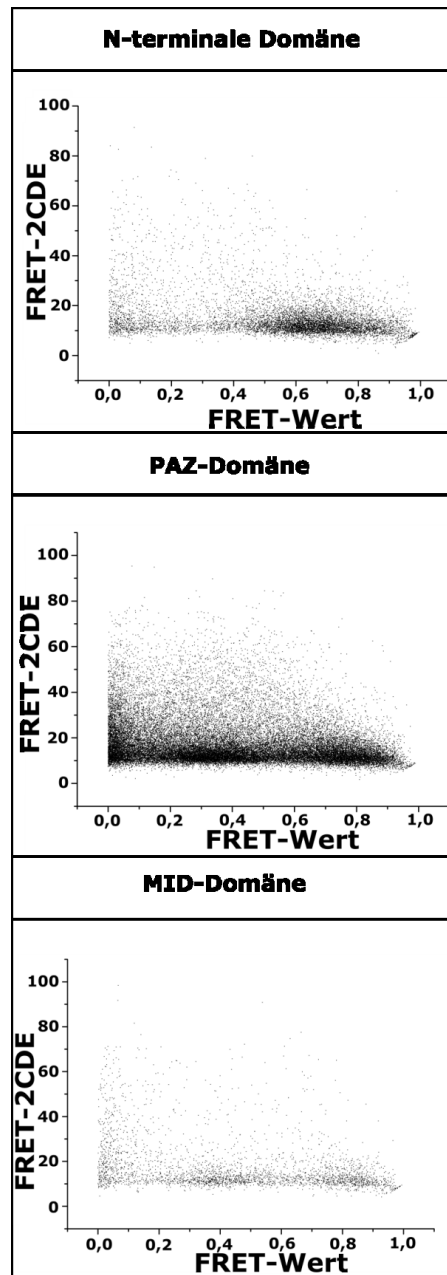


Abb. 4.8-3. Stabilitätsanalyse der erhaltenen ternären Komplexe. Daten entnommen aus Abb. 4.3-1. Es wurden die jeweils erhaltenen E-Werte nach Filterung nach Stöchiometriewerten gegen die zugehörigen FRET-2CDE-Werte aufgetragen. Ein Wert von 1 bedeutet dabei absolute Unveränderlichkeit der Werte während der Messung, ein Wert von 110 durchgängig dynamische Moleküle.

Aufgrund der beobachteten Abhängigkeit der Aktivität MjAgos von der Temperatur wurde, wie erwartet, nur geringe Dynamik während der Messung festgestellt. Die Messungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. In diesem Temperaturbereich wurde keine Bindung in EMSA-Studien beobachtet. Es wird deshalb davon ausgegangen, dass die notwendige Aktivierungsenergie für die Bindung und damit verbundene Konformationsänderungen nicht erreicht wurde. Da auch die Konformationsänderungen nach der Bindung einer Aktivierungsenergie unterliegen, werden durch die verhältnismäßig kühlen Messbedingungen eher starre Komplexe geformt. Es wurden demnach stabile Konformationen und keine Übergangszustände oder dynamische Strukturen betrachtet.

5. Diskussion

5.1. Aufreinigung und Expression

Durch rekombinante Expression in *E. coli* konnte MjAgo mit einem 6xHis-Tag erhalten werden. Die Optimierung der Expressionsbedingungen, insbesondere eine späte Induktion bei hoher optischer Dichte der Kultur, führten zur Expression erheblicher Mengen aktiven Proteins. Das optimierte Zellaufschluss- und Proteinreinigungsprotokoll führte durch Ultraschallzellaufschluss, anschließende Hitzedenaturierung der *E. coli*-Proteine und abschließender Purifikation durch IMAC mit Stoßelution zu einer hochkonzentrierten, hochreinen Proteinlösung. Ein ähnliches Vorgehen mit gesenkter Temperatur zur Hitzedenaturierung konnte erfolgreich auf Mutanten angewendet werden, welche in Einzelmolekül-FRET-Studien und Aktivitätsassays Verwendung fanden.

Nach Erstellung des Expressions- und Reinigungsprotokolls konnten Bindungsstudien durchgeführt werden. Diese zeigten, dass einzel- und doppelsträngige DNA gebunden wird. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch RNA und DNA/RNA-Hybride effektiv zur Bildung des ternären Komplexes aus doppelsträngigen Nukleinsäuren und MjAgo genutzt werden. Variation der Position eines Fluoreszenzfarbstoffs zeigte, dass ein Farbstoff an Position 18 des Leitstrangs den geringsten Einfluss auf die Bindungseffizienz aufweist. Anschließend konnten Aktivitätsassays etabliert werden, die die Charakterisierung der katalytischen Aktivität MjAgos anhand von denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglichten. Damit wurde gezeigt, dass MjAgo doppelsträngige DNA, jedoch keinerlei RNA oder einzelsträngige DNA prozessieren kann. Diese Exklusivität für DNA-Substrate existiert auch bei anderen prokaryotischen Argonaute-Vertretern wie *Naeronobacterium gregoryi* und *Thermus thermophilus*.^{22,101} Eine regulatorische Wirkung, wie sie von eukaryotischen Argonauten mittels Nutzung von RNA-Substraten durchgeführt wird, ist somit nicht mit MjAgo möglich.¹⁸¹

5.2. Identifikation der nukleolytischen Aktivität

MjAgo prozessiert jegliche doppelsträngige DNA, sofern die Reaktion bei mindestens 75°C ausgeführt wird und die Länge des Leitstrangs 15 Nukleotide oder mehr beträgt. Im Falle plasmidaler und genomischer DNA ist die Aktivität bei 37°C beobachtbar. Es wird die höchste Reaktionsgeschwindigkeit bei 85°C gefunden, bei 95°C verläuft der Abbau durch

MjAgo wieder langsamer. Dies kann zum einen in der Temperaturabhängigkeit des Doppelstrangs innerhalb des ternären Komplexes begründet sein. Eine Stabilisierung des Doppelstrangs durch MjAgo in einer für die Prozessierung notwendigen Konformation wird bei erhöhten Temperaturen unter Umständen nicht mehr ausreichend lange gewährleistet. Desweiteren kann eine partielle Degradation des Proteins nicht ausgeschlossen werden, sodass für die Bindung oder Prozessierung relevante Bereiche von MjAgo nicht nativ vorliegen.

Die Temperaturabhängigkeit der Aktivität MjAgos erlaubt die gezielte Steuerung des Aktivitätsmodus durch Wahl der jeweiligen Temperatur. Ohne Notwendigkeit der Einführung weiterer Modifikationen von Substrat oder Protein zur Unterdrückung oder Aktivierung der Nukleaseaktivität MjAgos können somit alle erhaltenen Daten als frei von Einflüssen dieser Modifikationen betrachtet werden.

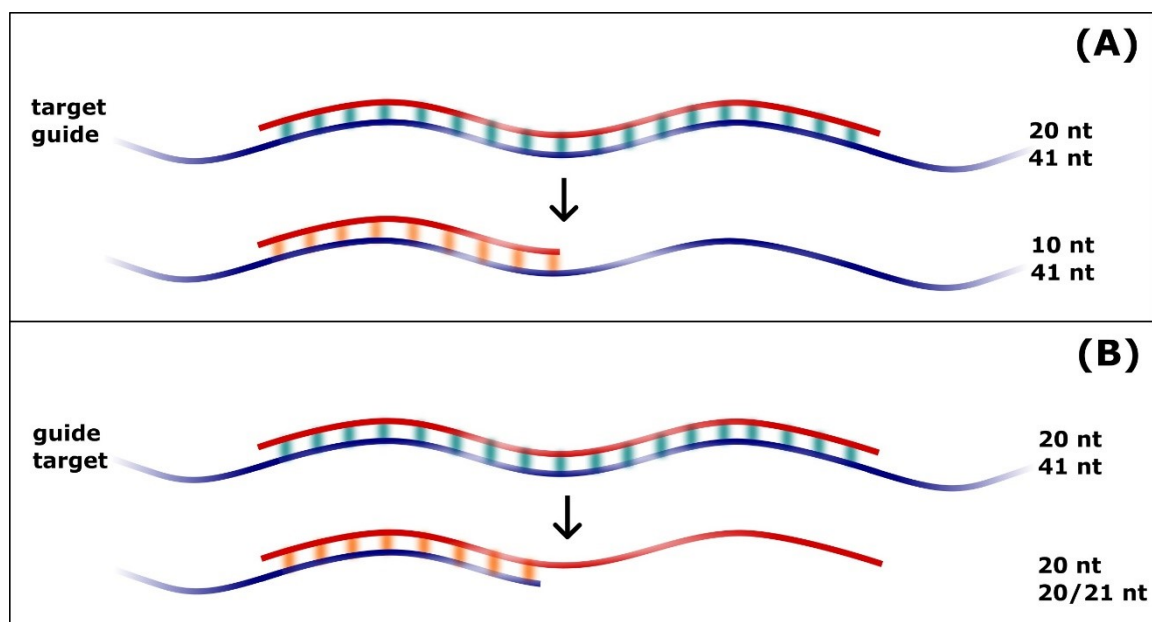


Abb. 5.2-1. Schematische Prozessierung des Konstrukts langer Leit-/kurzer Zielstrang. (A) Prozessierung des Zielstrangs mit entstehendem Produkt von 10 Nukleotiden Länge. (B) Verwendung der kurzen DNA als Leitstrang zur Prozessierung der langen DNA. In (A) und (B) entstehen jeweils Fragmente mit lediglich 10 bzw. 11 gepaarten Basen (dargestellt durch die orangenen Striche). Es konnte zuvor gezeigt werden, dass ein Leitstrang mit weniger als 15 Nukleotiden Länge nicht zu einer Prozessierung des Zielstrangs führt.

Für das let7-DNA-Konstrukt werden mehrere Degradationsprodukte gefunden. Die Anzahl und Größe dieser hängt vom 5'-Nukleotid des Leitstrangs, von der Phosphorylierung von Leit- und Zielstrang sowie der Länge beider Stränge ab. Dies spricht für mehrere Konformationen des ternären Komplexes mit unterschiedlichen Positionierungen der DNA

relativ zum aktiven Zentrum des Proteins. Dabei besteht die Möglichkeit, dass der Zielstrang auf unterschiedliche Art im Protein gebunden und dadurch stabilisiert werden kann, während die Konformation MjAgo annähernd unverändert bleibt. Desweiteren ist eine Änderung der Positionierung der Domänen MjAgo relativ zur PIWI-Domäne und damit eine Verschiebung des Zielstrangs in Relation zum aktiven Zentrum möglich. In beiden Fällen ist ein starrer Komplex mit einer einzigen schnittaktiven Konformation ausgeschlossen, da dies nur ein einzelnes Schnittprodukt erlauben würde. Verwendung der as2B- und siLuc-DNA-Konstrukte zeigten dieses Verhalten nicht (Abb. 4.6-1). Es wurde immer ein einzelnes Degradationsprodukt gefunden.

Ein 19-Nukleotid-Leitstrang führte zur höchsten Reaktionsgeschwindigkeit der untersuchten Konstrukte. Die Prozessierung von Zielsträngen mit Leitsträngen, die einer weiten Längenverteilung unterliegen, ist in guter Übereinstimmung mit weiteren, beschriebenen prokaryotischen Argonaute-Proteinen, welche Leitstrang-Längen von 14 bis 31 Nukleotiden akzeptieren.^{33,43,44,100,101,103} Die für die Bestimmung der Längenabhängigkeit verwendeten Leitstränge wurden am 3'-Ende gekürzt und zeigten dabei keine Veränderung der Größe der Hauptprodukte, wenn auch eine höhere Anzahl an Produkten ab einer Länge von 19 Nukleotiden entstand. Dies spricht für eine feste Verankerung des 5'-Endes in der MID-Domäne und für eine untergeordnete Bedeutung der Bindung in der PAZ-Domäne im ternären Komplex. Vergleichbare Versuche mit humanem Argonaute2 und *Pyrococcus furiosus* Argonaute zeigten das gleiche Verhalten.^{83,100} Konfokale Einzelmoleküluntersuchungen ergaben sodann auch, dass das 3'-Ende des Leitstrangs bei Bildung des ternären Komplexes aus der PAZ-Domäne durch Strecken der DNA entlassen wird,³⁰ vergleichbar mit den in *Thermus thermophilus* beobachteten Vorgängen sowie durch *pre-steady state kinetics* gezeigten Verhaltens im humanen Argonaute2.^{46,94} Die Prozessierung eines Konstrukts aus doppelsträngiger DNA mit je 41 Nukleotiden Länge zeigte einen sequenziellen Abbau durch MjAgo beginnend am 5'-Ende des Leitstrangs. Dabei wurde ein Primärprodukt nach weiterer Inkubation zu einem kleineren Hauptprodukt abgebaut. Degradation eines Konstrukts aus 41-Nukleotid langem Leitstrang und einem 20-Nukleotid-Zielstrang zeigte ebenfalls einen Abbau des Zielstrangs. Dabei ist eine kanonische Verankerung von 5'- und 3'-Ende des Leitstrangs Größenbedingt nicht möglich, sodass damit ein Hinweis auf einen zweiten Bindungsmodus für MjAgo belegt werden konnte, bei dem weder 3'- noch 5'-Ende des Leitstrangs in MjAgo gebunden

ist. Die Reaktion erfolgt in diesem Fall sehr langsam. Es besteht desweiteren die Möglichkeit, dass MjAgo nach einem erfolgten Schnitt den vorherigen Gegenstrang als Leitstrang bindet und somit den ehemaligen Leitstrang prozessieren kann. Dies würde ebenfalls zu einem graduellen Abbau eines Konstrukts führen und die stark herabgesetzte Reaktionsgeschwindigkeit erklären, allerdings nur im Falle eines Konstrukts mit hinreichend gleicher Länge.

Ein starker Größenunterschied, erzeugt durch das Konstrukt mit DNA-Längen von 20 und 41 Nukleotiden, führt zu einem Konstrukt mit unzureichender Länge von 10 Nukleotiden für eine Aktivität MjAgos (Abb. 5.2-1). Die Fähigkeit, auch sehr lange Leitstränge zu verwenden, wurde ebenfalls für MpAgo gezeigt.⁴⁴ Auch das humane Argonaute2 kann RNA mit einer Länge von 41 Nukleotiden prozessieren.⁷⁶ Die für das humane Argonaute2 notwendigen Überhänge des Leitstrangs über den Zielstrang sind für MjAgo nicht von Relevanz, eine effiziente Prozessierung fand mit allen getesteten DNA-Konstrukten statt.⁹⁰

5.3. Two-State model

Einzelmolekül-FRET-Studien zur Aufklärung der konformationellen Änderungen des Proteins während der Bindung von einzel- und doppelsträngiger DNA konnten erfolgreich etabliert werden. Zustände mit geringer Lebensdauer oder prozentual geringem Anteil an allen Zuständen sind somit zugänglich für Beobachtungen. Klassische Methoden wie Röntgenstrukturanalysen oder NMR-Strukturtechniken sind nicht in der Lage, diese Strukturen definiert abzubilden, sofern Dynamik vorherrscht oder Proben in mehreren Zuständen gleichzeitig vorliegen. Für die Einzelmolekülstrukturstudien wurde ein Fluorophore am Protein durch die Staudinger-Bertozzi-Ligation an einer unnatürlichen Aminosäure verankert. Aufgrund der zuvor beobachteten Temperaturabhängigkeit von Bindung und Degradation konnte der zu untersuchende Komplex aus DNA und markiertem Protein ohne Prozessierung der DNA gebildet werden. Die Isolierung des Komplexes von überschüssigem Farbstoff sowie freier DNA erfolgte über Größenausschlusschromatographie mit direkt folgender Einzelmolekülmessung an einem konfokalen Einzelmolekülfluoreszenzmikroskop mit alternierender Laseranregung, sodass in der Datenaufarbeitung eine Sortierung der Moleküle nach Stöchiometrie- und FRET-Effizienzwert gewährleistet wurde. Die geringe Ausbeute an gemessenen Molekülen mit einem FRET-durchführenden Farbstoffpaar im Verhältnis zu Spezies mit einem einzelnen

Farbstoff machte die zusätzliche Auswertung mit statistischen Filtern notwendig, obwohl die vorhergehende Sortierung Spezies mit einem einzelnen Farbstoff erfolgreich abtrennen konnte. Gleichzeitig konnte durch die Filter festgestellt werden, dass die gemessenen FRET-Spezies während der Messung im Rahmen der zeitlichen Auflösbarkeit konformationell stabil und nicht dynamisch waren. Mittelwertbildung und damit Verzerrung der Messwerte durch Dynamik der Farbstoffe wurden somit ausgeschlossen. Vor den Messungen durchgeführte Bindungsstudien zeigten, dass ein an den Leitstrang gekoppelter Farbstoff an Position 18 die geringste Auswirkung auf die Bindungsfähigkeit von MjAgo aufwies.

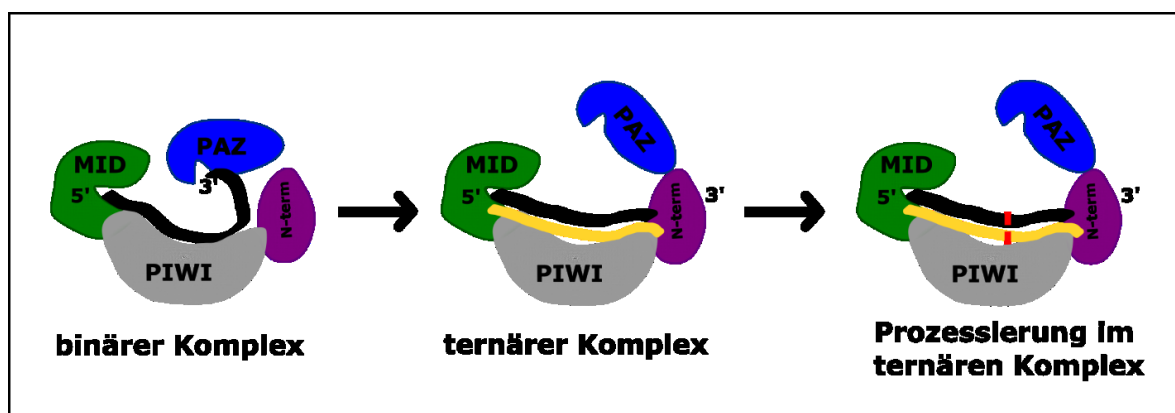


Abb. 5.3-1. Schematische Darstellung des Two-state-Modells. Das im binären Komplex in der PAZ-Domäne gebundene 3'-Ende der PAZ-Domäne wird bei Formung des ternären Komplexes durch Bindung des Zielstrangs aus der PAZ-Domäne entlassen, bevor der Zielstrang prozessiert wird (indiziert durch die gestrichelte Linie).

Die mit diesen Komplexen durchgeführten strukturellen Messungen ergaben sodann, dass große konformationelle Änderungen beim Übergang des binären zum ternären Komplex auftreten, hervorgerufen durch Strecken des zuvor geknickten Leitstrangs mit gleichzeitigem Entlassen des 3'-Endes aus der PAZ-Domäne ohne Prozessierung des Zielstrangs.³⁰ In allen Messungen des ternären Komplexes wurden zwei Populationen gefunden. Dies spiegelt zum einen wider, dass nicht alle Proteine vollständig mit einem Doppelstrang abgesättigt sind. Kobayashi et al. schlagen einen Mechanismus vor, welcher den binären Komplex des Argonautes als die energetisch bevorzugte Form benennt⁹³, sodass von einem Gleichgewicht zwischen *apo*-Form, binärem und ternären Komplex ausgegangen werden kann. Trotz Überschuss des Zielstrangs in *Electro mobility shift assay*-Studien konnte keine vollständige

Absättigung des Proteins erreicht werden. Der Vergleich der FRET-Populationen von binärem und ternären Komplex zeigte, dass eine Population mit hohem E-Wert für beide Komplexe gefunden wird. Diese Population stellt den binären Komplex dar, die Population mit geringerem E-Wert die neue Konformation, hervorgerufen durch Bindung des Zielstrangs und dadurch ausgelöste allosterische Konformationswechsel mit Entlassung des 3'-Endes des Leitstrangs aus der PAZ-Domäne. Eine Flexibilität der PAZ-Domäne, schwankend zwischen gebundener und ungebundener Form,³¹ muss an dieser Stelle auch berücksichtigt werden. Das Argonaute-Protein würde also trotz der Formung des ternären Komplexes zwischen einer aktiven und einer inaktiven Form durch Verschiebung der PAZ-Domäne wechseln. Eine Überlagerung dieses Vorgangs mit dem Gleichgewicht zwischen binärem und ternären Komplex ist nicht auszuschließen. Das von Tomari und Zamore vorhergesagte Two-state-Modell, in welchem eine Entlassung des Leitstrangs aus der PAZ-Domäne bei Bindung des Zielstrangs vor der Prozessierung durch Argonaute stattfindet⁵⁵, kann damit trotzdem bestätigt werden (Abb. 5.3-1), da nur ein einzelner Zustand für den binären Komplex gefunden wird, Strukturänderungen aber mit der Formung des ternären Komplexes offensichtlich werden. Pre-steady-state-Kinetik-Untersuchungen in hAgo2 bestätigen diese Beobachtung. Diese zeigen, dass eine Bindungsphase entfällt, wenn Bindungsfehler in der 3'-Region des Leitstrangs eingeführt werden. Es entfällt diese Bindungsphase ebenfalls bei Nutzung einer Mutante mit 9 Punktmutationen in der PAZ-Domäne, welche die Bindung der RNA nicht mehr ermöglichen.⁹⁴ Durch die fehlende Bindungsmöglichkeit in der PAZ-Domäne wird der Leitstrang demnach direkt in einem Zustand gebunden, der dem aus der PAZ-Domäne entlassenen Zustand gleicht.

5.4. Einfluss terminaler Phosphate

Eine Abhängigkeit von einer Phosphatgruppe am 5'-Ende des Leitstrangs wie bei *Thermus thermophilus*²³ und *Pyrococcus furiosus*¹⁰⁰ besteht nicht, eine 5'-Hydroxylgruppe am Leitstrang führt allerdings zu einer erheblichen Verlangsamung der Reaktion. Eine Nutzung von Leitsträngen mit 5'-Hydroxylgruppe wurde für *Marinitoga piezophila* Argonaute beschrieben. Dieser Vertreter einer CRISPR-cas-assoziierten Subfamilie der Argonaute-Proteine nutzt allerdings im Gegensatz zu MjAgo präferentiell 5'-hydroxylierte RNA-Leitstränge und erreicht damit eine höhere Reaktionsgeschwindigkeit als mit 5'-phosphatgruppentragenden RNA-Leitsträngen.⁴⁴ MpAgo weist eine besondere Bindetasche auf, die für die Bindung von Hydroxyltermini optimiert ist. Im Gegensatz zu

anderen Argonaute-Proteinen wurde in MpAgo eine hydrophobe MID-Bindetasche gefunden, welche die geladene Phosphatgruppe abstoßen würde.⁴⁴ In anderen bekannten Argonauten findet eine Fixierung des 5'-Phosphats des Leitstrangs in der hydrophilen MID-Bindetasche statt,^{16,2218} das entsprechende konservierte Motiv aus den vier Aminosäuren Tyrosin, Lysin, Glutamin und Lysin existiert auch in MjAgo.¹⁹ Ohne diese Fixierung des Phosphats ist eine stabile Positionierung des Leitstrangs in Argonaute nicht möglich, die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt erheblich. Das humane Argonaute2 ist in der Lage, sowohl 5'-phosphorylierte als auch 5'-hydroxylierte Leitstränge in ähnlicher Weise wie MjAgo mit herabgesetzter Geschwindigkeit zu verarbeiten.⁸³ Da intensive Wechselwirkungen des Proteins mit dem Rückgrat der Nukleinsäuren auftreten, können diese zwar eine Bindung ermöglichen, allerdings nicht die korrekte Positionierung gewährleisten. Fehlerhaft positionierte Leitstränge ermöglichen sodann auch nicht die korrekte Positionierung des Zielstrangs und damit assoziierte Konformationswechsel, welche für die Prozessierung durch das jeweilige Argonaute notwendig sind.

Das Einbringen einer zusätzlichen Phosphatgruppe am Zielstrang erhöht die Geschwindigkeit der Reaktion mit MjAgo und senkt gleichzeitig die Anzahl der erhaltenen Produkte ab. Bisher konnte nicht geklärt werden, wie dieser Effekt entsteht. Die Existenz einer zweiten Bindetasche in der MID-Domäne, wie sie in NcAgo gefunden wurde, würde eine stabile Fixierung des Zielstrangs ermöglichen. Eine alternative Bindetasche, die bei einer 3'-Hydroxyl-terminalen DNA zwei mögliche Positionierungen des Leitstrangs ermöglicht, würde zu einer unterschiedlichen Positionierung des Leitstrangs führen und damit zu mehreren Degradationsprodukten. Dieses Verhalten wurde zwar für let7-DNA gefunden, nicht aber für as2B- und siLuc-Konstrukte. Die Positionierung der zuletzt genannten Konstrukte findet auch ohne 3'-Phosphatgruppe des Zielstrangs ausreichend stabil statt, um ein definiertes Produkt zu liefern. Belegung der angenommenen zweiten Bindetasche mit der 3'-terminalen Phosphatgruppe eines Zielstrangs reduziert demnach die Anzahl der Reaktionsprodukte durch stabile Positionierung des Leitstrang-Zielstrang-Konstrukts innerhalb des Proteins. Dadurch entstehende thermodynamische Stabilisierung könnte der Identifikation spezieller Substrate dienen, die Herkunft dieser ist allerdings vollständig unklar. In der Kristallstruktur von MjAgo wurde keine entsprechende zweite Bindetasche identifiziert.¹⁹ Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass MjAgo innerhalb der Zelle Teil eines Komplexes ist, in welchem es lediglich die katalytische Funktion

wahrnimmt, die Identifikation einzelner Substrate dabei durch andere Proteine gewährleistet wird. Sollte dieser Komplex existieren, bestehen aktuell keine experimentellen Hinweise darauf. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurde der Einfluss der Phosphatgruppe am Zielstrang nicht in der Literatur beschrieben und es kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen entsprechender phosphorylierter Zielstränge innerhalb einer Zelle eine biologische Funktion ausschliesst.

5.5. Einfluss 5'-terminaler Nukleotide

Bei verschiedenen Argonauten besteht eine Bindungspräferenz für ein bestimmtes 5'-Nukleotid des Leitstrangs, während einige keine Präferenz aufweisen. In *Arabidopsis thaliana* findet die Zuordnung der jeweiligen RNA-Leitstränge zum passenden Argonaute-Protein über das 5'-Nukleotid statt.^{182,183}

Tab. 5.5-1. Übersicht über die 5'-Nukleotidpräferenz sowie Beschaffenheit der 5'-Endes der Leitstränge der verschiedenen Argonauten.

Organismus	Domäne	Leitstrang-Nukl.	Zielstrang-Nukl.	Leitstrang-5'-Ende	Leitstrang-5'-Nukleotid	Quelle
<i>Thermus thermophilus</i>	Bakterien	DNA	DNA	Phosphat	C	⁴³
<i>Pyrococcus furiosus</i>	Archäen	DNA	DNA	Phosphat	unbekannt	¹⁰⁰
<i>Aquifex aeolicus</i>	Archäen	DNA/RNA	RNA	Phosphat	unbekannt	¹⁷
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Bakterien	DNA/RNA	DNA/RNA	Phosphat	U oder C	¹⁰⁴
<i>Natronobacterium gregoryi</i>	Archäen	DNA	DNA	Phosphat	variabel	¹⁰¹
<i>Marinitoga piezophila</i>	Bakterien	RNA	DNA/RNA	Hydroxylgruppe	variabel	⁴⁴

Aktivitätsassays zeigten einen starken Einfluss des 5'-Nukleotids auf das Schnittverhalten MjAgos. Dabei variierte die Anzahl der Reaktionsprodukte sowie die Reaktionsgeschwindigkeit, wobei Purinbasen zu einer schnelleren Prozessierung führten als Pyrimidinbasen. Den stärksten Einfluss zeigt ein Leitstrang mit 5'-Guanin, mit der geringsten Anzahl an Schnittprodukten und dem höchsten Umsatz in der gegebenen Zeit.

Dies spricht für eine Präferenz eines Guanins als 5'-Nukleotid, auch wenn die Dissoziationskonstante sowohl für Purin- als auch Pyrimidinbasen gleich ist.¹⁹ Die unterschiedlichen Produktmuster entstehen vermutlich durch eine Verschiebung der vornehmlich über das Phosphatrückgrat gebundenen Leitstränge^{18,20,24,38,44} in Abhängigkeit von der Positionierung des 5'-Nukleotids innerhalb des Proteins. Mutationsstudien und die Kristallstruktur von MjAgo zeigen einen starken Einfluss der 3¹⁰-Helix am N-terminalen Ende der α 12-Helix auf das Prozessierungsverhalten.¹⁹ Dieser Einfluss des 5'-Nukleotids auf das entstehende Schnittmuster konnte bisher für andere Vertreter der Argonaute-Familie nicht beobachtet werden. Sowohl für Argonaute aus *Pyrococcus furiosus* als auch *Thermus thermophilus* ist das gefundene Schnittmuster für alle 5'-Nukleotide unverändert.^{43,100} Desweiteren konnte der Einfluss des zweiten Nukleotids auf das Prozessierungsverhalten beobachtet werden. Dieser verändert das Produktmuster im geringeren Maße, allerdings ist die Reaktionsgeschwindigkeit umso stärker beeinflusst. Es wurde desweiteren die Korrelation gefunden, dass die geringste Anzahl an Produkten bei der höchsten Reaktionsgeschwindigkeit entsteht, potentiell durch eine spezifischere Bindung des Substrats mit einhergehender stabilerer Positionierung. Kinetische Untersuchungen benennen das Freisetzen des 3'-Endes des Leitstrangs aus der PAZ-Domäne als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt,⁹⁴ sodass eine Geschwindigkeitsveränderung durch eine allosterische Konformationsänderung, hervorgerufen durch Bindung in der seed-Region, bedingt ist durch die Effektivität der Entlassung des 3'-Endes aus der PAZ-Domäne. Immunopräzipitationen des endogenen Argonautes mit nachfolgender Sequenzierung der isolierten DNA zur Klärung der *in-vivo*-gebundenen Nukleinsäuren stehen aus. Diese könnten klären, ob die gefundenen Präferenzen eine Widerspiegelung im Organismus finden oder eine annähernd gleichverteilte und damit unspezifische Bindung eines breiten Spektrums an Nukleinsäurezusammensetzungen in der Zelle vorherrscht. Es ist erwähnenswert, dass die beobachteten Änderungen der Produktverteilung nur für die let7-Sequenz gelten. Zum Vergleich verwendete siLuc- und as2b-Konstrukte zeigten auch hier keine Änderung der Schnittprodukte, wenn das 5'-Ende des Leitstrangs modifiziert wurde. Allerdings führt der Abbau des siLuc-Leitstrangs zu einem kleineren Hauptprodukt als bei den anderen beiden Sequenzen. Alle drei Sequenzen wurden mit einer unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeit prozessiert. Da MjAgo ausschließlich bei erhöhten Temperaturen diese DNA-Konstrukte abbaut, erscheint der für *Thermus*

thermophilus Argonaute berechnete *induced-fit*-Mechanismus auch für MjAgo zu gelten.¹⁸⁴ Dabei sind allosterisch ausgelöste Konformationswechsel nach anfänglicher, unvollständiger Bindung zur vollständigen Bindung ausschlaggebend. Die Bindung von Leitsträngen durch *Aquifex aeolicus* Argonaute zeigte in *Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy*-Messungen eine zweiphasige Bindung. Damit zusammen durchgeführte *molecular dynamics*-Berechnungen zeigen eine Flexibilität von N-terminaler und PAZ-Domäne und belegen ebenfalls zur Bindung notwendige Konformationswechsel.¹⁷ Pre-steady-state-Kinetikmessungen belegen einen *induced-fit*-Mechanismus für das humane Argonaute2.⁹⁴ In allen Versuchen konnte gezeigt werden, dass sich zunächst ein labiler Komplex mit teilweiser Paarung der Nukleinsäure bildet, welcher anschließend Konformationsänderungen auslöst und dadurch die komplette Bindung der Nukleinsäure ermöglicht. Dem liegt eine Optimierung in Hinsicht auf das Verhältnis von Erkennungsgeschwindigkeit und -genauigkeit der Nukleinsäuren zu Grunde. Eine Erhöhung der Erkennungsgeschwindigkeit führt gleichzeitig zu einem instabileren Komplex, umgekehrt führt eine erhöhte Erkennungsgenauigkeit zu einem dramatischen Verlust der korrespondierenden Erkennungsgeschwindigkeit. Bindung im Bereich der Seed-Region mit anschließender vollständiger Bindung stellt den optimierten Mittelweg dar.^{57,58,185} Die Kristallstruktur zeigt für MjAgo eine Helix-Faltblatt-Gelenk-Region zwischen PAZ- und MID-Domäne, ähnlich zu beobachteten Strukturen im humanen Argonaute2 und *Pyrococcus furiosus* Argonaute.^{16,19,59} Diese Region scheint die Positionierung des Leitstrangs in Abhängigkeit vom 5'-Nukleotid zu beeinflussen und könnte die Geschwindigkeit der Reorganisation des Proteins ebenfalls beeinflussen. Die Eröffnung des Zugangs zu mehreren stabilen Zuständen durch die jeweilige Substratsequenz wäre eine weitere Erklärung für die unterschiedlichen Abbauprodukte.

5.6. Prozessierung zirkulärer DNA

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keine Restriktion der Prozessierung durch MjAgo anhand der Substratgröße, der Beschaffenheit des 5'-Endes oder der Sequenz existiert. Die konsequente Weiterführung dieser Beobachtung führte zur Feststellung, dass MjAgo plasmidale und genomische DNA leitstrangunabhängig prozessieren kann. Dabei findet zunächst eine Linearisierung mit nachfolgender unspezifischer Degradation statt.

Nutzung einer katalytisch inaktiven Mutante zeigt keine Prozessierung der jeweiligen DNA, sodass eine nicht detektierbare Kontamination durch den Aufreinigungsprozess ausgeschlossen wird. Bemerkenswert ist, dass der Prozess selbst bei vergleichsweise geringen Temperaturen von 37°C stattfindet, sodass die zuvor besprochenen Konformationswechsel in diesem Fall entweder nicht notwendig sind oder andere Konformationen adaptiert werden, welche eine geringere Aktivierungsenergie aufweisen. Bei Temperaturen oberhalb von 75°C findet eine zusätzliche Beschleunigung statt, vermutlich hervorgerufen durch thermisches Atmen,^{19,186} welches MjAgo ermöglicht, zunächst einen Einzelstrang des Plasmids bzw. der genomischen DNA zu binden und einen einzelnen Schnitt durchzuführen. Dies resultiert in einem freien Ende eines Einzelstrangs und einem, wie zuvor bereits beschriebenen, Abbau des Gegenstranges, insgesamt in einem graduellen Abbau von nicht-kanonisch zu bindender DNA. Die dabei entstehenden Fragmente sind bis auf einen geringen Anteil zu kurz, um als Leitstrang verwendet zu werden.¹⁸⁷ Versuche mit vollständig prozessiertem Plasmid zur Beladung MjAgos mit dem geringen Anteil Plasmid-gewonnener Leitstränge zeigten sodann einen Beschleunigungsmechanismus der Degradation. Dies spricht dafür, dass MjAgo invasive DNA unspezifisch und langsam verarbeiten kann, um mit den dadurch gewonnenen Leitsträngen eine spezifische Prozessierung weiterer invasiver Elemente schneller durchführen zu können. Es konnte gezeigt werden, dass die Reaktionsgeschwindigkeit der Plasmiddegradation bei 85°C ähnlich stark erhöht wie im Falle einer leitstranggeführten Prozessierung war. Auch dabei konnte zunächst die Linearisierung des Substrats beobachtet werden. Es wird daraus geschlossen, dass die Erhöhung der Abbaugeschwindigkeit dem gleichen Mechanismus bei der leitstranggeführten Plasmiddegradation und der Prozessierung kurzer Nukleinsäuren folgt. Dieser Prozess führt zu einer Beschleunigung während des Abbaus mehrerer Plasmide, da es keinen Hinweis darauf gibt, dass die initiale Prozessierung an einer definierten Sequenz beginnt. Dadurch werden mehrere Plasmide beginnend an verschiedenen Positionen degradiert und es entsteht eine hohe Anzahl unterschiedlicher Leitstränge, die den weiteren Abbau beschleunigen. In der Kristallstruktur konnte sodann auch ein potentieller, zweiter Bindungskanal gefunden werden, der in anderen bisher bekannten prokaryotischen Argonaute-Strukturen nicht gefunden wurde.^{19,187} Mittels Immunodetektion konnte der Nachweis erbracht werden, dass MjAgo konstitutiv exprimiert wird. Da bisher kein

Mechanismus gefunden wurde, der die Aktivität MjAgo begrenzt oder steuert, wurde ein potentieller Einfluss der Methylierung der Substrate untersucht. Die getestete genomische DNA aus *S. acidocaldarius*, *P. furiosus* und *M. jannaschii* mit den entsprechenden Methylierungen wurden im gleichen Maße prozessiert wie aus *E. coli* gewonnene Plasmide mit dcm- und dam-Methylierungsmuster. Eine Selektion innerhalb des Organismus über diese Modifikation ist damit auszuschließen. Für die Argonaute-Proteine aus *Pyrococcus furiosus*, *Thermus thermophilus* und *Natronobacterium gregoryi* konnte die Leitstranggeführte Prozessierung von Plasmiden *in-vitro* gezeigt werden.^{43,100,101} Dabei ist kein vollständiger Abbau des Plasmids wie im Falle MjAgo, sondern eine Linearisierung beobachtet wurden. Die leitstrangfreie Inkubation eines *super-coiled* Plasmids mit PfAgo zeigte eine Entwindung des Plasmids, allerdings keine Degradation.¹⁰⁰ Die Zugabe von Leitsträngen zur Plasmiddegradation zeigte eine Beschleunigung, wenn die Leitstränge eine zum Plasmid passende Sequenz aufwiesen, und eine Verlangsamung, wenn dies nicht der Fall war. Sequenzierung der co-aufgereinigten Nukleinsäuren aus rekombinant exprimiertem TtAgo zeigte allerdings Fragmente des Expressionsplasmids, deren Ursprung nicht geklärt wurde.⁴³ Für das Argonaute aus *Rhodobacter sphaeroides* konnte *in vivo* die Degradation eines Plasmids in *E. coli* durch Sequenzierung der an RsAgo gebundenen Nukleinsäuren nachgewiesen werden. Dies ist umso bemerkenswerter, als das RsAgo katalytisch inaktiv ist. Die Inaktivierung des endogenen *Rhodobacter sphaeroides* Argonaute führte sodann auch zu einer Erhöhung der Expression plasmid-vermittelter Gene. Die katalytische Inaktivität lässt allerdings auf einen anderen Mechanismus zur Geninaktivierung als bei MjAgo schließen, bei dem RsAgo eine dirigierende Rolle einnimmt.¹⁰³

In der Kristallstruktur von MjAgo wurde ein positiv geladener Kanal zwischen N-terminaler und PIWI-Domäne gefunden, der zusätzlich zum Nukleinsäurebindungskanal anderer Vertreter der Argonaute-Familie zwischen MID- und PAZ-Domäne eine alternative Bindung der DNA ermöglichen könnte. Eine Mutation in diesem zweiten Bindungskanal verhinderte sodann auch die Prozessierung der untersuchten DNA-Konstrukte, sodass die Bedeutung für die Bindung der Nukleinsäuren belegt werden konnte. In den bisherigen Kristallstrukturen konnte keine gebundene DNA in diesem Kanal identifiziert werden, welche die Rolle des Kanals definitiv identifizieren würde.¹⁹

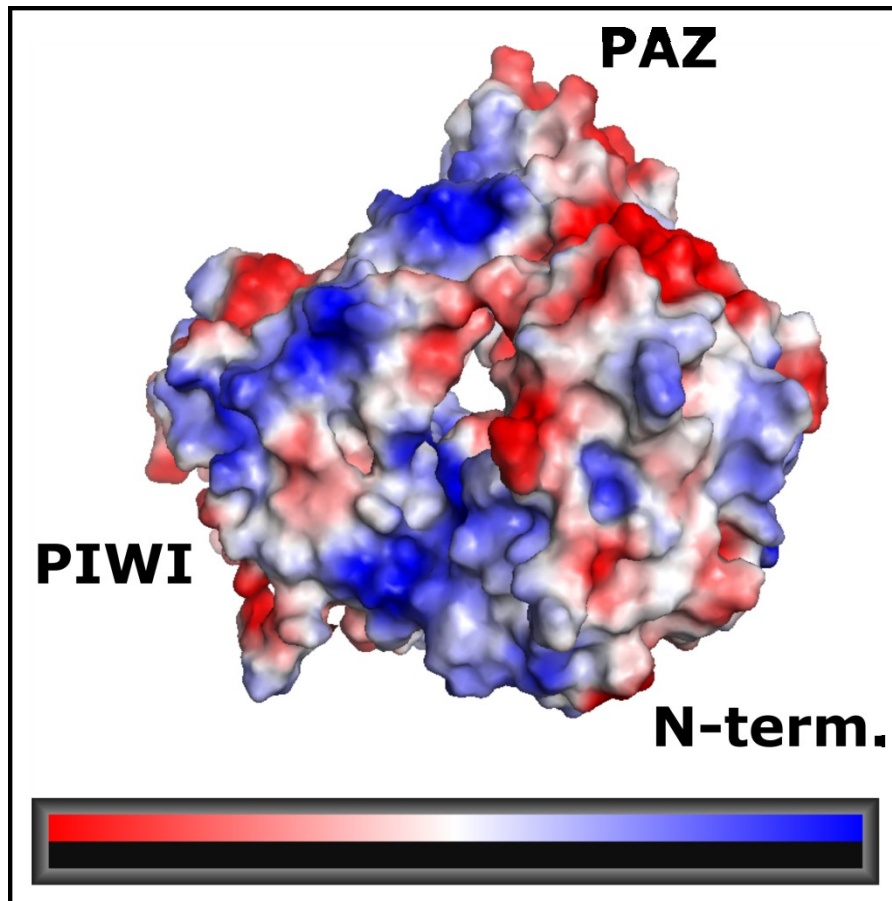


Abb. 5.6-1. Darstellung der Oberflächenladung von MjAgo. Abbildung erzeugt aus PDB 5G5S. Rote Bereiche: negative Ladung, blaue Bereiche: positive Ladung. Die Farbintensität entspricht der Ladungsstärke. Der potentielle zweite Bindungskanal zwischen N-terminaler und PIWI-Domäne ist an der positiven Ladung erkennbar.

In *Methanocaldococcus jannaschii* sind 6 Histone bekannt, HMjA1 bis HMjA5 sowie das einzigartige HMj, welches eine C-terminale Erweiterung von 28 Aminosäuren aufweist, die in keinen anderen archäellen Histonen gefunden werden. Die Histone binden die DNA in Abständen, die mit steigender Konzentration geringer werden. Durch sterische Hinderung ist eine Hydrolyse der chromatinisierten DNA sodann nicht mehr möglich.¹⁸⁸ Die Prozessierung von durch das Histon HMjA3 geschützter DNA mittels MjAgo zeigten *in vitro* keinen Abbau.¹⁸⁷ Es entsteht damit das Modell, dass MjAgo keinen Erkennungsmechanismus hat, um zwischen zelleigen und zellfremd zu diskriminieren. Vielmehr wird jegliche invasive DNA degradiert, die nicht vom Histonsystem geschützt wird.

5.7. Einordnung als Defensivsystem

Bisher gefundene, Archäen befallende Viren weisen ausschließlich einzel- oder doppelsträngige DNA-Genome auf,¹⁸⁹ sodass die exklusive Prozessierung von DNA durch MjAgo eine Anpassung an das Zielsystem darstellen kann. Dabei könnte eine direkte Prozessierung von Viren mit doppelsträngiger DNA stattfinden, einzelsträngige Genome können gebunden und damit eine weitere Infektion unterbunden werden. Die hohe virale Mutationsrate lässt die Erkennungssequenzen zelleigener Endonukleasen verschwinden, aus Restriktions-Modifikationssystemen werden die Methylasen entnommen oder die virale DNA wird vor der Prozessierung durch ein R-M-System modifiziert, sodass keine Erkennung mehr stattfinden kann.^{109–113} Die Anfälligkeit der immanenten Zellimmunsysteme für diese Methoden der Umgehung des R-M-Systems macht einen Mechanismus äußerst wertvoll, in dem die Inaktivierung möglicher Pathogene frei von umgeharen Erkennungsmustern ist. Durch die Beschleunigung des Abbaus bei wiederholter Exposition ist das System sowohl in der Lage, breitflächig und universell zu arbeiten als auch die benötigte Reaktionsgeschwindigkeit bereit zu stellen, um eine große Anzahl an Viren von einer Infektion abzuhalten.

Da die geladenen Leitstränge wieder entladen werden können,³⁰ entsteht kein Erinnerungseffekt vergleichbar mit dem CRISPR-cas-System.¹⁹⁰ Es wäre möglich, dass ein CRISPR-assoziiertes System die entlassenen Leitstränge anschließend weiter prozessiert und dadurch ein molekulares Gedächtnis zur langfristigen Virenabwehr aufbaut. Entsprechende CRISPR-loci sind in *M. jannaschii* in großer Zahl auffindbar.^{116,123,191} Dementgegen spricht die Größe der entstehenden Abbauprodukte, da vom CRISPR-System genutzte Spacer zwischen 21 und 72 Basenpaare aufweisen,^{123,190,192} die Endprodukte der Degradation durch MjAgo allerdings zwischen 8 und 13 Nukleotiden.¹⁸⁷ Eine reverse Transkriptase könnte vom CRISPR-System bereitgestellte RNAs in für MjAgo nutzbare Leitstränge transkribieren. Die hohe Dichte Archäen infizierender Viren sowie der durch das CRISPR-System hervorgerufene evolutionäre Druck begünstigen eine Rekombination der viralen Bestandteile bei gleichzeitig hoher Mutationsrate,^{189,193} sodass eine unspezifische Degradation zur Abwehr eines bis dato unbekannten Virus eine Notwendigkeit zum Überleben des Organismus darstellt.

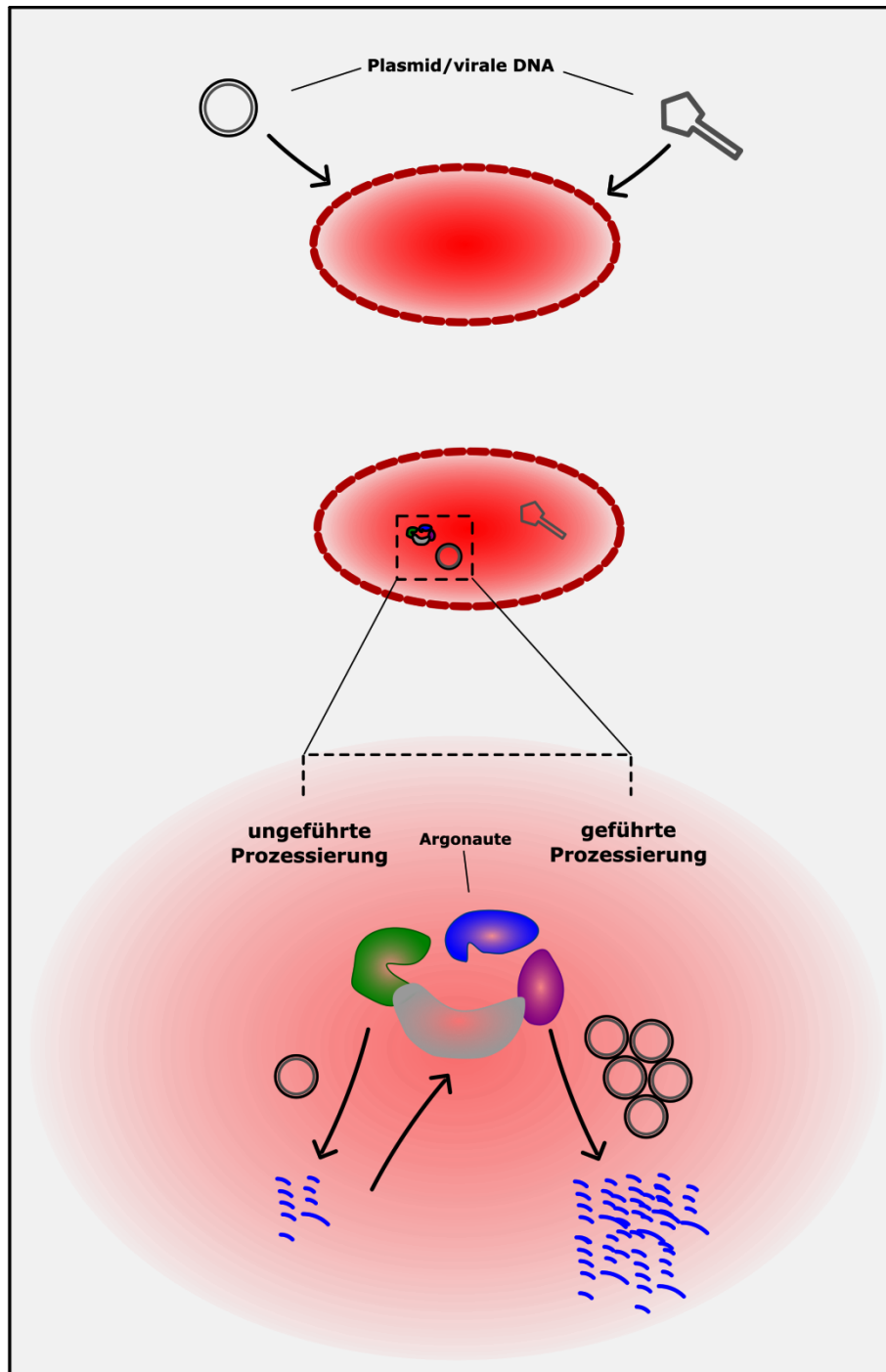


Abb. 5.7-1. Schematische Darstellung des Mechanismus der Selbstbeschleunigung. Nach Infektion mit viraler oder plasmidaler DNA erfolgt die ungeföhrte, langsame Degradation dieser durch MjAgo. Die entstehenden Fragmente ermöglichen die geföhrte, schnellere Prozessierung zur Abwehr weiterer invasiver Elemente.

Sollten die Sequenzen mutiert sein, die bei einer früheren, fehlgeschlagenen Infektion der Zelle durch das CRISPR-System adaptiert wurden, stellt dieses keinen ausreichenden Schutz mehr dar. Eine Adaption MjAgos an ein Pathogen ist nicht zur Durchführung der Pathogenabwehr notwendig, auf Grundlage der vorliegenden Daten, wenn auch nur *in*

vitro gewonnen, soll somit eine Einordnung MjAgos in das immanente Immunsystem erfolgen. MjAgo stellt demnach ein System zur DNA-geführten DNA-Interferenz dar, komplementär zum RNA-geführten DNA-Interferenz-System, welches durch CRISPR-cas dargestellt wird.

Es ist zu beachten, dass das System, so wie es charakterisiert wurde, eine potentielle Gefahr für die genomische Integrität der Zelle darstellt, da eine Dissoziation der Histone im ungünstigen Fall zur Prozessierung der genomischen DNA führt. Das Dissoziations-Assoziations-Verhältnis hängt, nebst anderen Faktoren, von der Konzentration der Histone innerhalb der Zelle ab.¹⁸⁸ Eine entsprechend hohe Konzentration gewährleistet demnach einen effektiven Schutz vor MjAgo. Im Falle einer einzelnen Prozessierung sind die normalen Reperatursysteme der Zelle zur Wiederherstellung der genomischen Integrität ausreichend. Desweiteren scheitert dieses System, sollte invasive DNA chromatinisiert werden, bevor MjAgo seine Aktivität entfalten kann. Ein entsprechender Vorgang wird von einer hohen Konzentration an Histonen allerdings unterstützt.

5.8. Ausblick

Infektionsstudien von *M. jannaschii* zum Vergleich der Resistenz von Stämmen mit aktivem oder inaktivem Argonaute könnten die postulierte biologische Rolle von MjAgo belegen. Dabei wäre eine starke Abnahme der Resistenz im Falle des inaktivierten Argonauten zu erwarten. Da bisher kein System zur genetischen Manipulation von *M. jannaschii* etabliert ist, wären pull-down-Experimente vor und nach Infektion der Zellen mit anschließender Sequenzierung der an MjAgo gebundenen Aminosäuren einfacher umzusetzen. Eine starke Erhöhung der dem viralen Genom zuzuordnenden DNA-Fragmente würde den Beweis der Abwehraufgabe von MjAgo erbringen. Desweiteren könnten Aminosäuren, die von MjAgo ohne Infektion der Zellen *in vivo* gebunden werden, Rückschlüsse auf potentielle weitere Aufgaben des Enzyms erlauben. Aufgrund der anspruchsvollen Handhabung von *M. jannaschii* und der theoretischen Unabhängigkeit der Aktivität von MjAgo vom jeweiligen Expressionsorganismus wären auch Infektionsexperimente mit anderen Organismen denkbar. Eine Infektion von *E. coli* mit Phagen, welche ein Genom aus doppelsträngiger DNA besitzen, sollte mit überexprimiertem MjAgo einen anderen Verlauf nehmen als bei einem Stamm ohne MjAgo. Die verhältnismäßig geringe Temperatur, die zur Kultivierung von *E. coli* notwendig ist, könnte aber auch die Aktivität MjAgos auf ein Maß einschränken,

welches keine effektive Abwehr mehr ermöglicht. *Pyrococcus furiosus*, thermophil und genetisch zugänglich,¹⁰⁰ könnte mit vorhergehender Inaktivierung des endogenen Argonautes ein Modellsystem zur Überprüfung der Resistenz gegenüber viralen Infektionen mit überexprimiertem MjAgo darstellen.

Von besonderem Interesse ist auch die Identifikation von potentiellen *in vivo*-Protein-Interaktionspartnern bzw. Cofaktoren. Insbesondere ist zu klären, ob MjAgo Komplexe formt und, sollte dies der Fall sein, welche Rolle es in diesen Komplexen einnimmt. Da kein Selektionsmechanismus für die Substratauswahl gefunden wurde, ist ein System denkbar, in dem MjAgo lediglich eine katalytische Aufgabe erfüllt und ein Interaktionspartner die Spezifität durch Zuführung der Substrate gewährleistet. Desweiteren ist ein Repressor Teil des Erwartungshorizonts, welcher spezifisch die Aktivität MjAgos unterdrückt und bei Infektion der Zelle entfernt wird. Dies setzt voraus, dass ein weiteres System die Erkennung von zellfremd und zelleigen übernimmt und in der Lage ist, bei Erkennung von invasiver DNA entweder direkt den Repressor zu entfernen oder einen entsprechenden Signalweg zu aktivieren, der zur Aktivierung des bis dahin inaktiven MjAgos führt.

Es wurden in dieser Arbeit strukturelle Untersuchungsmethoden etabliert, welche die Beobachtung der konformationellen Zustandsänderungen MjAgos in Abhängigkeit von der gebundenen DNA-Spezies durch Einzelmolekül-FRET-Messungen zulassen. Bisherige Messungen zeigen eine starke Flexibilität aller Domänen sowie der gebundenen DNA. Eine genauere Untersuchung dieses strukturellen Verhaltens ist speziell im Hinblick auf die Erkenntnis interessant, dass Mutationsstudien unterschiedliche Aminosäuren für die Bindung eines Guanin- und eines Thymin-Leitstrangs andeuten.¹⁹ Auch der strukturelle Unterschied bei Nutzung anderer Sequenzen ist beobachtbar, speziell im Hinblick auf eine Vereinbarkeit von Konformation und entstehendem Prozessierungsmuster. Die durch Mutationsstudien vorhergesagte Entwindung der Nukleinsäuren durch die N-terminale Domäne⁴⁸ könnte ebenfalls strukturell untersucht werden. Weitere Experimente mit einer Mutante, welche zwei Farbstoffe im Protein verankert hat, können zu tieferen Erkenntnissen über die stabilen Zustände des *apo*-Enzyms führen. Immobilisierung dieser Mutante und Stabilisierung der verwendeten Farbstoffe können die Möglichkeit erschließen, die bei der Bindung auftretenden Vorgänge in Echtzeit zu beobachten. Dafür notwendig sind allerdings Farbstoffe, die bei den hohen Temperaturen photostabil bleiben. Die Beobachtung struktureller Unterschiede bei der Bindung von RNA im

Vergleich zur Bindung von DNA ermöglichen tiefe Einblicke in das Wesen der Unterscheidung der Nukleinsäurespezies durch MjAgo.

6. Quellenverzeichnis

1. Woese, C. R. & Fox, G. E. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 5088–5090 (1977).
2. Woese, C. R., Kandler, O. & Wheelis, M. L. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 4576–4579 (1990).
3. Delong, E. F. Everything in moderation: Archaea as ‘non-extremophiles’. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**, 649–654 (1998).
4. Valentine, D. L. Adaptations to energy stress dictate the ecology and evolution of the Archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 316–23 (2007).
5. Schäfer, G., Engelhard, M. & Müller, V. Bioenergetics of the Archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**, 570–620 (1999).
6. Spang, A. *et al.* Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* **521**, 173–179 (2015).
7. Rivera, M. C., Jain, R., Moore, J. E. & Lake, J. A. Genomic evidence for two functionally distinct gene classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 6239–6244 (1998).
8. McInerney, J. O., O’Connell, M. J. & Pisani, D. The hybrid nature of the Eukaryota and a consilient view of life on Earth. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 449–55 (2014).
9. Jones, W. J., Leigh, J. A., Mayer, F., Woese, C. R. & Wolfe, R. S. *Methanococcus jannaschii* sp. nov., an extremely thermophilic methanogen from a submarine hydrothermal vent. *Arch. Microbiol.* **136**, 254–261 (1983).
10. Bult, C. J. *et al.* Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science (80-.)*. **273**, 1058–1073 (1996).
11. Bohmert, K. *et al.* AGO1 defines a novel locus of Arabidopsis controlling leaf development. *EMBO J.* **17**, 170–180 (1998).
12. Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D. & Aravin, A. A. PIWI-interacting small RNAs : the vanguard of genome defence. *Nat. Publ. Gr.* **12**, 246–258 (2011).

13. Hutvagner, G. & Simard, M. J. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 22–32 (2008).
14. Peters, L. & Meister, G. Argonaute Proteins: Mediators of RNA Silencing. *Mol. Cell* **26**, 611–623 (2007).
15. Nowotny, M., Gaidamakov, S. A., Crouch, R. J. & Yang, W. Crystal structures of RNase H bound to an RNA/DNA hybrid: Substrate specificity and metal-dependent catalysis. *Cell* **121**, 1005–1016 (2005).
16. Song, J.-J., Smith, S. K., Hannon, G. J. & Joshua-Tor, L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* **305**, 1434–7 (2004).
17. Rashid, U. J. *et al.* Structure of Aquifex aeolicus argonaute highlights conformational flexibility of the PAZ domain as a potential regulator of RNA-induced silencing complex function. *J. Biol. Chem.* **282**, 13824–32 (2007).
18. Elkayam, E. *et al.* The structure of human argonaute-2 in complex with miR-20a. *Cell* **150**, 100–110 (2012).
19. Willkomm, S. *et al.* Structural and mechanistic insights into the DNA-guided DNA endonuclease activity of an archaeal Argonaute. *Unpublished*
20. Nakanishi, K., Weinberg, D. E., Bartel, D. P. & Patel, D. J. Structure of yeast Argonaute with guide RNA. *Nature* **486**, 368–374 (2012).
21. Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E. & Weichenrieder, O. Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *PNAS* **108**, 1–6 (2011).
22. Sheng, G. *et al.* Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 652–7 (2014).
23. Swarts, D. C. *et al.* The evolutionary journey of Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 743–53 (2014).
24. Schirle, N. T. & Macrae, I. J. The Crystal Structure of Human Argonaute2. *Scienceexpress*

- 1–4 (2012).
25. Martinez, J. & Tuschl, T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* **18**, 975–980 (2013).
 26. Schwarz, D. S., Tomari, Y. & Zamore, P. D. The RNA-Induced Silencing Complex Is a Mg²⁺-Dependent Endonuclease. *Curr. Biol.* **14**, 787–791 (2004).
 27. Ding, L. & Han, M. GW182 family proteins are crucial for microRNA-mediated gene silencing. *Trends Cell Biol.* **17**, 411–416 (2007).
 28. Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M. C. Slicer function of Drosophila Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* **2**, 2837–2848 (2005).
 29. Hauptmann, J. *et al.* Turning catalytically inactive human Argonaute proteins into active slicer enzymes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 814–7 (2013).
 30. Zander, A., Holzmeister, P., Klose, D., Tinnefeld, P. & Grohmann, D. Single-molecule FRET supports the two-state model of Argonaute action. *RNA Biol.* **11**, 45–56 (2014).
 31. Jung, S.-R. *et al.* Dynamic anchoring of the 3'-end of the guide strand controls the target dissociation of Argonaute-guide complex. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 16865–71 (2013).
 32. Gu, S., Jin, L., Huang, Y., Zhang, F. & Kay, M. A. Slicing-independent RISC activation requires the argonaute PAZ domain. *Curr. Biol.* **22**, 1536–1542 (2012).
 33. Miyoshi, T., Ito, K., Murakami, R. & Uchiumi, T. Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat. Commun.* **7**, 11846 (2016).
 34. Schirle, N. T., Sheu-Gruttadauria, J. & MacRae, I. J. Structural basis for microRNA targeting. *Science (80-.).* **346**, 608–613 (2014).
 35. Frank, F., Sonenberg, N. & Nagar, B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* **465**, 818–22 (2010).
 36. Boland, A., Tritschler, F., Heimstädt, S., Izaurralde, E. & Weichenrieder, O. Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep.* **11**, 522–7 (2010).

37. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 346–353 (2008).
38. Wang, Y., Sheng, G., Juranek, S., Tuschl, T. & Patel, D. J. Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* **456**, 209–213 (2008).
39. Wang, Y. *et al.* Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* **456**, 921–926 (2008).
40. Ma, J.-B. *et al.* Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* **434**, 666–70 (2005).
41. Djuranovic, S. *et al.* Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 144–150 (2010).
42. Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N. & Nagar, B. Arabidopsis Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *EMBO J.* **31**, 3588–95 (2012).
43. Swarts, D. C. *et al.* DNA-guided DNA interference by a prokaryotic Argonaute. *Nature* **507**, 258–61 (2014).
44. Kaya, E. *et al.* A bacterial Argonaute with noncanonical guide RNA specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201524385 (2016). doi:10.1073/pnas.1524385113
45. Ghildiyal, M. & Zamore, P. D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet.* **10**, 94–108 (2009).
46. Wang, Y. *et al.* Nucleation, propagation and cleavage of target RNAs in Ago silencing complexes. *Nature* **461**, 754–61 (2009).
47. Wang, B. *et al.* Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 1259–66 (2009).
48. Kwak, P. B. & Tomari, Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 145–151 (2012).
49. Wee, L. M., Flores-Jasso, C. F., Salomon, W. E. & Zamore, P. D. Argonaute divides its RNA guide into domains with distinct functions and RNA-binding properties. *Cell* **151**,

1055–1067 (2012).

50. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120**, 15–20 (2005).
51. Grimson, A. *et al.* MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105 (2007).
52. Doench, J. G. & Sharp, P. A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes (Basel)*. **504**, 504–511 (2004).
53. Willkomm, S., Zander, A., Gust, A. & Grohmann, D. A Prokaryotic Twist on Argonaute Function. *Life* **5**, 538–553 (2015).
54. Parker, J. S., Roe, S. M. & Barford, D. Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* **23**, 4727–37 (2004).
55. Tomari, Y. & Zamore, P. D. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* **19**, 517–29 (2005).
56. Haley, B. & Zamore, P. D. Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 599–606 (2004).
57. Künne, T., Swarts, D. C. & Brouns, S. J. J. Planting the seed: target recognition of short guide RNAs. *Trends Microbiol.* **22**, 74–83 (2014).
58. Klein, M., Chandradoss, S. D., Depken, M. & Joo, C. Why Argonaute is needed to make microRNA target search fast and reliable. *Semin Cell Dev Biol* 1–9 (2016).
59. Chandradoss, S. D., Schirle, N. T., Szczepaniak, M. & Macrae, I. J. A Dynamic Search Process Underlies MicroRNA Targeting. *Cell* **162**, 96–107 (2016).
60. Meister, G. *et al.* Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol. Cell* **15**, 185–197 (2004).
61. Ender, C. & Meister, G. Argonaute proteins at a glance. *J. Cell Sci.* **123**, 1819–23 (2010).
62. Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. & Hannon, G. J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293–296

- (2000).
63. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Lührmann, R. & Tuschl, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563–574 (2002).
 64. Hansen, T. B. *et al.* Argonaute-associated short introns are a novel class of gene regulators. *Nat Commun* **7**, 1–10 (2016).
 65. Bartel, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
 66. Wilson, R. C. & Doudna, J. a. Molecular mechanisms of RNA interference. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 217–39 (2013).
 67. Han, J. *et al.* Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* **125**, 887–901 (2006).
 68. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–9 (2003).
 69. Han, J. *et al.* The Drosha – DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 3016–3027 (2004). doi:10.1101/gad.1262504.mic
 70. Lund, E. & Dahlberg, J. E. Substrate selectivity of exportin 5 and Dicer in the biogenesis of microRNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **71**, 59–66 (2006).
 71. Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E. & Kutay, U. Nuclear Export of MicroRNA. *Science (80-.).* **303**, 95–98 (2004).
 72. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209–216 (2003).
 73. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
 74. Haase, A. D. *et al.* TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* **6**, 961–7 (2005).
 75. Fabian, M. R., Sonenberg, N. & Filipowicz, W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 351–379 (2010).

76. Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W. & Hannon, G. J. A Dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. **465**, 584–589 (2010).
77. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* **20**, 1885–1898 (2006).
78. Carthew, R. W. & Sontheimer, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642–55 (2009).
79. Zhang, H., Kolb, F. A., Brondani, V., Billy, E. & Filipowicz, W. Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. **21**, 5875–5885 (2002).
80. Rand, T. a, Petersen, S., Du, F. & Wang, X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* **123**, 621–9 (2005).
81. Hutvagner, G. & Zamore, P. D. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056–60 (2002).
82. Yekta, S., Shih, I. & Bartel, D. P. MicroRNA-Directed Cleavage of HOXB8 mRNA. *Science (80-.).* **304**, 594–596 (2004).
83. Rivas, F. V *et al.* Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 340–9 (2005).
84. Miyoshi, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H. & Siomi, M. C. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* **19**, 2837–48 (2005).
85. Iwasaki, S. *et al.* Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Mol. Cell* **39**, 292–299 (2010).
86. Tan, G. S. *et al.* Expanded RNA-binding activities of mammalian Argonaute 2. *Nucleic Acids Res.* **37**, 7533–45 (2009).
87. Hannon, G. RNA interference. *Nature* **418**, 24–26 (2002).
88. Blaszczuk, J. *et al.* Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure* **9**, 1225–1236 (2001).

89. Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834–838 (2001).
90. Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* **20**, 6877–6888 (2001).
91. Pillai, R. S., Artus, C. G. & Filipowicz, W. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *Rna Soc.* **10**, 1518 (2004).
92. Smalheiser, N. R. & Gomes, O. L. a. Mammalian Argonaute-DNA binding? *Biol. Direct* **10**, 27 (2014).
93. Kobayashi, H. & Tomari, Y. RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1859**, 71–81 (2016).
94. Deerberg, A., Willkomm, S. & Restle, T. Minimal mechanistic model of siRNA-dependent target RNA slicing by recombinant human Argonaute 2 protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 17850–5 (2013).
95. Deng, Y. *et al.* Therapeutic potentials of gene silencing by RNA interference: principles, challenges, and new strategies. *Gene* **538**, 217–27 (2014).
96. Aagaard, L. & Rossi, J. J. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 75–86 (2007).
97. Makarova, K. S., Wolf, Y. I., van der Oost, J. & Koonin, E. V. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol. Direct* **4**, 29 (2009).
98. Makarova, K. S., Wolf, Y. I. & Koonin, E. V. Comparative genomics of defense systems in archaea and bacteria. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4360–77 (2013).
99. Yuan, Y.-R. *et al.* Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol. Cell* **19**, 405–19 (2005).
100. Swarts, D. C. *et al.* Argonaute of the archaeon *Pyrococcus furiosus* is a DNA-guided

- nuclease that targets cognate DNA. *Nucleic Acids Res.* 1–10 (2015).
doi:10.1093/nar/gkv415
101. Gao, F., Shen, X. Z., Jiang, F., Wu, Y. & Han, C. DNA-guided genome editing using the *Natronobacterium gregoryi* Argonaute. *Nat. Biotechnol.* 1–7 (2016).
doi:10.1038/nbt.3547
 102. Sheng, G. *et al.* Structure-based cleavage mechanism of *Thermus thermophilus* Argonaute DNA guide strand-mediated DNA target cleavage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 652–7 (2014).
 103. Olovnikov, I., Chan, K., Sachidanandam, R., Newman, D. K. & Aravin, A. A. Bacterial Argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol. Cell* **5**, (2013).
 104. Olovnikov, I., Chan, K., Sachidanandam, R., Newman, D. K. & Aravin, A. a. Bacterial argonaute samples the transcriptome to identify foreign DNA. *Mol. Cell* **51**, 594–605 (2013).
 105. Matsunaga, F., Norais, C., Forterre, P. & Myllykallio, H. Identification of short ‘eukaryotic’ Okazaki fragments synthesized from a prokaryotic replication origin. *EMBO Rep.* **4**, 154–8 (2003).
 106. Simon, D. M. & Zimmerly, S. A diversity of uncharacterized reverse transcriptases in bacteria. *Nucleic Acids Res.* **36**, 7219–7229 (2008).
 107. Brüssow, H. & Hendrix, R. W. Phage Genomics: Small is beautiful. *Cell* **108**, 13–16 (2002).
 108. Forterre, P. & Prangishvili, D. The great billion-year war between ribosome- and capsid-encoding organisms (cells and viruses) as the major source of evolutionary novelties. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1178**, 65–77 (2009).
 109. Williams, R. J. Restriction endonucleases: classification, properties, and applications. *Mol. Biotechnol.* **23**, 225–243 (2003).
 110. Xu, T., Yao, F., Zhou, X., Deng, Z. & You, D. A novel host-specific restriction system associated with DNA backbone S-modification in *Salmonella*. *Nucleic Acids Res.* **38**, 7133–7141 (2010).

111. Labrie, S. J., Samson, J. E. & Moineau, S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 317–327 (2010).
112. Tock, M. R. & Dryden, D. T. F. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 466–472 (2005).
113. McGrath, S., Seegers, J. F. M. L., Fitzgerald, G. F. & Van Sinderen, D. Molecular characterization of a phage-encoded resistance system in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1891–1899 (1999).
114. Syed, M. A. & Lévesque, C. M. Chromosomal bacterial type II toxin–antitoxin systems. *Can. J. Microbiol.* **58**, 553–562 (2012).
115. Zhao, X. & Magnuson, R. D. Percolation of the Phd repressor-operator interface. *J. Bacteriol.* **187**, 1901–1912 (2005).
116. Sorek, R., Kunin, V. & Hugenholtz, P. CRISPR—a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**, 181–186 (2008).
117. van der Oost, J., Jore, M. M., Westra, E. R., Lundgren, M. & Brouns, S. J. J. CRISPR-based adaptive and heritable immunity in prokaryotes. *Trends Biochem. Sci.* **34**, 401–407 (2009).
118. Grissa, I., Vergnaud, G. & Pourcel, C. The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats. *BMC Bioinformatics* **8**, 172 (2007).
119. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429–33 (1987).
120. Jansen, R., Embden, J. D. a Van, Gaastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565–75 (2002).
121. Barrangou, R. *et al.* CRISPRProvides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes. *Science (80-.).* **315**, 1709–1712 (2007).

122. Makarova, K. S., Brouns, S. J. J., Horvath, P., Sas, D. F. & Wolf, Y. I. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* **9**, 467–477 (2012).
123. Lillestøl, R. K., Redder, P., Garrett, R. a & Brügger, K. A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* **2**, 59–72 (2006).
124. Lin, G. G. & Scott, J. G. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol.* **100**, 130–134 (2012).
125. Makarova, K. S., Grishin, N. V. & Koonin, E. V. The HicAB cassette, a putative novel, RNA-targeting toxin-antitoxin system in archaea and bacteria. *Bioinformatics* **22**, 2581–2584 (2006).
126. Brouns, S. J. J. *et al.* Small Crispr Rnas Guide Antiviral Defense in Prokaryotes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **2**, 531–535 (2008).
127. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M. & Doudna, J. A. A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Scienceexpress* (2012).
128. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-.).* **346**, 1258096–1258096 (2014).
129. Dupuis, M.-È., Villion, M., Magadán, A. H. & Moineau, S. CRISPR-Cas and restriction-modification systems are compatible and increase phage resistance. *Nat. Commun.* **4**, 2087 (2013).
130. Fonfara, I. *et al.* Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2577–2590 (2014).
131. Al-Attar, S., Westra, E. R., Van Der Oost, J. & Brouns, S. J. J. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs): The hallmark of an ingenious antiviral defense mechanism in prokaryotes. *Biol. Chem.* **392**, 277–289 (2011).
132. Nuñez, J. K. *et al.* Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 528–34 (2014).
133. Deltcheva, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor

- RNase III. *Nature* **471**, 602–607 (2011).
134. Stokes, G. G. On the Change of Refrangibility of Light. *Philos. Trans. R. Soc. London* **143**, 463–562 (1852).
 135. Jablonski, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* **131**, 839–840 (1933).
 136. Forster, T. Energiewanderung und Fluoreszenz. *Naturwissenschaften* **33**, 166–175 (1946).
 137. Gust, A. *et al.* A starting point for fluorescence-based single-molecule measurements in biomolecular research. *Molecules* **19**, 15824–65 (2014).
 138. Hohlbein, J., Craggs, T. D. & Cordes, T. Alternating-laser excitation: single-molecule FRET and beyond. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 1156–71 (2013).
 139. Weiss, S. Fluorescence spectroscopy of single biomolecules. *Science* **283**, 1676–1683 (1999).
 140. Kapanidis, A. N. *et al.* Alternating-laser excitation of single molecules. *Acc. Chem. Res.* **38**, 523–533 (2005).
 141. Kapanidis, A. N. *et al.* Fluorescence-aided molecule sorting: analysis of structure and interactions by alternating-laser excitation of single molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 8936–8941 (2004).
 142. Lee, N. K. *et al.* Accurate FRET measurements within single diffusing biomolecules using alternating-laser excitation. *Biophys. J.* **88**, 2939–53 (2005).
 143. Nir, E. *et al.* Shot-noise limited single-molecule FRET histograms: Comparison between theory and experiments. *J. Phys. Chem. B* **110**, 22103–22124 (2006).
 144. Roy, R., Hohng, S. & Ha, T. A practical guide to single-molecule FRET. *Nat. Methods* **5**, 507–516 (2008).
 145. Okamoto, K. Introduction of FRET Application to Biological Single-molecule Experiments. *Int. J. Biophys.* **3**, 9–17 (2013).
 146. Moerner, W. E. & Fromm, D. P. Methods of single-molecule fluorescence spectroscopy

- and microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **74**, 3597–3619 (2003).
147. Ploetz, E. *et al.* Fluorescence resonance energy transfer and protein-induced fluorescence enhancement as synergetic multi-scale molecular rulers. *Nat. Publ. Gr.* 1–37 (2016). doi:10.1101/047779
 148. Müller, B. K., Zaychikov, E., Bräuchle, C. & Lamb, D. C. Pulsed Interleaved Excitation. *Biophys. J.* **89**, 3508–3522 (2005).
 149. Haustein, E. & Schwille, P. Ultrasensitive investigations of biological systems by fluorescence correlation spectroscopy. *Methods* **29**, 153–166 (2003).
 150. Sahoo, H. & Schwille, P. FRET and FCS — Friends or Foes ? *ChemPhysChem* **12**, 532–541 (2011).
 151. Van den Berg, P. A. W., Feenstra, K. A., Mark, A. E., Berendsen, H. J. C. & Visser, A. J. W. G. Dynamic conformations of flavin adenine dinucleotide: Simulated molecular dynamics of the flavin cofactor related to the time-resolved fluorescence characteristics. *J. Phys. Chem. B* **106**, 8858–8869 (2002).
 152. Kapanidis, A. N. & Weiss, S. Fluorescent probes and bioconjugation chemistries for single-molecule fluorescence analysis of biomolecules. *J. Chem. Phys.* **117**, 10953–10964 (2002).
 153. Lu, H. P., Xun, L. & Xie, X. S. Single-Molecule Enzymatic Dynamics. *Science (80-.).* **282**, 1877–1882 (1998).
 154. Ryan, C. P. *et al.* Tunable reagents for multi-functional bioconjugation: reversible or permanent chemical modification of proteins and peptides by control of maleimide hydrolysis. *Chem. Commun. (Camb).* **47**, 5452–4 (2011).
 155. Kim, Y. *et al.* Efficient Site-Specific Labeling of Proteins via Cysteines Younggyu. *Bioconj. Chem.* **19**, 786 (2008).
 156. Noren, C. J., Anthony-cahill, S. J., Griffith, M. C., Schultz, P. G. & April, I. A General Method for Site-Specific Incorporation of Unnatural Amino Acids into Proteins. *Science* **244**, 182–188 (1989).

157. Chin, J. W. *et al.* Addition of p-azido-L-phenylalanine to the genetic code of Escherichia coli. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 9026–7 (2002).
158. Young, T. S., Ahmad, I., Yin, J. a & Schultz, P. G. An enhanced system for unnatural amino acid mutagenesis in E. coli. *J. Mol. Biol.* **395**, 361–74 (2010).
159. Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. a & Bertozzi, C. R. Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 19–24 (2002).
160. Johnson, D. B. F. *et al.* Release Factor One Is Nonessential in Escherichia coli. *ACS Chem. Biol.* **7**, 1337–1344 (2012).
161. Wals, K. & Ovaa, H. Unnatural amino acid incorporation in E. coli: current and future applications in the design of therapeutic proteins. *Front. Chem.* **2**, 15 (2014).
162. Neumann, H. Rewiring translation – Genetic code expansion and its applications. *FEBS Lett.* **586**, 2057–2064 (2012).
163. Neumann-Staubitz, P. & Neumann, H. The use of unnatural amino acids to study and engineer protein function. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **38**, 119–128 (2016).
164. Gerdes, S. Y. *et al.* Experimental Determination and System Level Analysis of Essential Genes in Escherichia coli MG1655. **185**, 5673–5684 (2003).
165. Mukai, T. *et al.* Codon reassignment in the Escherichia coli genetic code. *Nucleic Acids Res.* **38**, 8188–8195 (2010).
166. Isaacs, F. J. *et al.* Precise Manipulation of Chromosomes in Vivo Enables Genome-Wide Codon Replacement. *Science (80-.).* **333**, 348–353 (2011).
167. Liu, C. C. & Schultz, P. G. Adding New Chemistries to the Genetic Code. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 413–444 (2010).
168. Bertozzi, C. R. A Decade of Bioorthogonal Chemistry. *Acc Chem Res* **44**, 651–653 (2011).
169. Chakraborty, A., Dongye, W., Yon, E. & Ebright, R. Azide-specific labelling of biomolecules by Staudinger-Bertozzi ligation: Phosphine Derivatives of fluorescent probes suitable for single-molecule fluorescence spectroscopy. *Natl. Inst. Heal.* **472**,

- (2010).
170. Milles, S. *et al.* Click strategies for single-molecule protein fluorescence. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 5187–95 (2012).
 171. Ramil, C. P. & Lin, Q. Bioorthogonal chemistry : strategies and recent development. *Chem Commun* **49**, 11007–11022 (2014).
 172. Codelli, J. A., Baskin, J. M., Agard, N. J. & Bertozzi, C. R. Second-Generation Difluorinated Cyclooctynes for Copper-Free Click Chemistry. *JACS* **130**, 11486–11493 (2008).
 173. Almeida, G. De, Sletten, E. M., Nakamura, H., Palaniappan, K. K. & Bertozzi, C. R. Thiacycloalkynes for Copper-Free Click Chemistry ** Angewandte. *Angew. Chemie Int. Ed.* **51**, 2443–2447 (2012).
 174. Hirtreiter, A. *et al.* Spt4/5 stimulates transcription elongation through the RNA polymerase clamp coiled-coil motif. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4040–4051 (2010).
 175. Urban, A., Neukirchen, S. & Jaeger, K. E. A rapid and efficient method for site-directed mutagenesis using one-step overlap extension PCR. *Nucleic Acids Res.* **25**, 2227–8 (1997).
 176. Grohmann, D. *et al.* The Initiation Factor TFE and the Elongation Factor Spt4/5 Compete for the RNAP Clamp during Transcription Initiation and Elongation. *Mol. Cell* **43**, 263–274 (2011).
 177. Tomov, T. E. *et al.* Disentangling subpopulations in single-molecule FRET and ALEX experiments with photon distribution analysis. *Biophys. J.* **102**, 1163–73 (2012).
 178. Tsukanov, R., Tomov, T. E., Berger, Y., Liber, M. & Nir, E. Conformational dynamics of DNA hairpins at millisecond resolution obtained from analysis of single-molecule FRET histograms. *J. Phys. Chem. B* **117**, 16105–16109 (2013).
 179. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4 (1979).
 180. Zander, A., Holzmeister, P., Klose, D., Tinnefeld, P. & Grohmann, D. Single-molecule

- FRET supports the two-state model of Argonaute action. *RNA Biol.* **11**, 45–56 (2014).
181. Meister, G. Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nat. Rev. Genet.* **14**, 447–59 (2013).
 182. Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* **49**, 493–500 (2008).
 183. Mi, S. *et al.* Sorting of Small RNAs into Arabidopsis Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell* **133**, 116–127 (2010).
 184. Zhu, L. *et al.* A Flexible Domain-domain Hinge Promotes an Induced-fit Dominant Mechanism for the Loading of Guide-DNA into Argonaute Protein in *Thermus Thermophilus*. *J. Phys. Chem. B* acs.jpcc.5b12426 (2016). doi:10.1021/acs.jpcc.5b12426
 185. Savir, Y. & Tiusty, T. Conformational proofreading: The impact of conformational changes on the specificity of molecular recognition. *PLoS One* **2**, (2007).
 186. Prohofsky, E. W., Lu, K. C., Van Zandt, L. L. & Putnam, B. F. Breathing modes and induced resonant melting of the double helix. *Phys. Lett. A* **70**, 492–494 (1979).
 187. Zander, A. *et al.* Guide-independent DNA silencing by Argonaute.
 188. Wilkinson, S. P., Ouhammouch, M. & Geiduschek, E. P. Transcriptional activation in the context of repression mediated by archaeal histones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 6777–6781 (2010).
 189. Pietilae, M. K., Demina, T. A., Atanasova, N. S., Oksanen, H. M. & Bamford, D. H. Archaeal viruses and bacteriophages: Comparisons and contrasts. *Trends Microbiol.* **22**, 334–344 (2014).
 190. Wiedenheft, B., Sternberg, S. H. & Doudna, J. a. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* **482**, 331–8 (2012).
 191. Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C., Soria, E. & Juez, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol. Microbiol.* **36**, 244–246 (2000).

192. Horvath, P. & Barrangou, R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**, 167–170 (2010).
193. Andersson, A. F. & Banfield, J. F. Virus population dynamics and acquired virus resistance in natural microbial communities. *Science* **320**, 1047–50 (2008).

7. Anhang

7.1. Sequenz *Methanocaldococcus jannaschii* Argonaute-Gen

ATGGTTTTAAATAAAGTTACATATAAAATAAATGCATACAAAATAAAAAGAAGATTATTCCTAAAGAA
GTGCATTTCTATAGAATTAAGTTTTGTTAATGAAGCATTTAATTTTATAGATTGTAAATTTTATGG
TGGCATGATAATTAATAAAAAAGATAAAGTTTTGTTTTACCATACAAAGTTGATAATAAAGTATTGAA
ATACAAAGATGGAAATAACGAAATCCCAATAGACATTGAATATATTAAATCATTAAAATTAGAATATGT
AAAACCAGAAATAGCTGAAAACTTGTTAGGGGATATCTTAAATCTGTCCATAAAATAGAGCCAGAAT
TATCAAGAATTATAAAAAACATTAGAAAACACAAAGTAGTGGAATAATAAAGTTGAGTCATATTGT
GAGTATGAAGTTAAAAACATGATGGGGATTATTATCTTATATTAACTTTAGACATACAGCGTCTATT
ACAAAACACTTATGGGATTTTGTTAATAGAGATAAAGCACTATTAGAGGAGTATGTTGGGAAAAAGAT
TATCTTTAAACCTAATCCAAAGGTAAGATATACAATTTCACTGGTTGATGCTCCAAACCCTCAAAAATA
GAGGAAATAATGAGTCACATAATTAAATATTACAAATGGTCTGAAGATATGGTAAATCTACTTTTGG
GGAGATTGATTATAATCAACCCATTATGTATTGTGAAGAAATCTTAGAACCATTGCTCCACAATTTGT
AATCTTGATTTTATATGGATGAATTAGATAGCTATATTCTTAAAGAATTGCAGAGTTATTGGAGATTAT
CTAATGAAAATAAGGGAAAAATTATAAATGAAATAGCAAAAAAATCTAGATTTATAGATAATACACCT
AAAGAATTAGAATTTATGAAATTAATAATACTCCATTGCTCGTGAAGGATGTAAATAAAAATCCTACC
AAAATATATTCAACAAATACATTATTTACGTGGATTTACAATCAAAATGCAAAAATATATCTCCCATATG
ATGTCCAGAAATTATAAGGAACAAAAATTTATTAACATACATACTTATTGATGAGGAAATCAAGGATG
AATTAAGCTATTAAGATAAAGTAAATAAAATGTTTAGAACTATAACAAAATTGCTAATAAAACA
GAATTGCCAAATCAATTATGCCAATAGATGGAAATATTTTCTACAGATGACATTAGGGGAATTATA
AAAGAAATAAAATCTGAATTTAATGATGAAATATGTTTTCGTTAATTATTGGAAAAGAAAAATACAAA
GATAATGATTATTATGAAATTTGAAAAACAACTTTTGATTTAAAAATAATCTCTCAAAATATATTAT
GGGAAAATTGGAGGAAAGATGACAAAGGATATATGACTAATAATTTACTTATACAAATTATGGGAAAA
TTGGGGATTAAATATTTTATCTTAGATTCTAAGACACCTTATGATTACATAATGGGACTTGACACTGGAT
TGGGAATTTTGGTAATCATAGAGTTGGAGGTTGCACTGTGGTATATGACTCAGAAGGTAAAATAAGA
AGAATACAGCCAATAGAGACACCAGCTCCAGGAGAACGGTTACATCTGCCGTATGTAATAGAATATTT
AGAAAATAAAGCAAACATTGATATGGAAAATAAAAAATATTCTATTCTTAAGAGATGGTTTTATTCAGAA
TTCTGAAAGAAATGACCTAAAAGAAATCTCTAAAGAACTAAATCAAATATTGAAGTAATTAGCATTAG
AAAAACAATAAATATAAAGTTTTTACGTCTGATTATAGAATTGGAAGTGATTTGGAAATGATGGTAT
CTTCTTACCTCACAAAACCTCATTTGGTTCAAATCCTGTAAAATTATCAACTTGGTTAAGGTTTAATTGT
GGAAATGAAGAAGGGTTAAAAATTAATGAATCAATTATGCAATTGTTATATGATTTAACTAAAATGAA
CTATTCTGCACTATATGGAGAAGGTAGATATCTTAGAATTCCAGCACCACATTATGCAGATAAATT
TGTTAAAGCACTTGGTAAAAATTGGAAAATAGATGAAGAACTGCTAAAGCATGGATTCTTATATTTTCA
ATAA

7.2. Sequenz *Methanocaldococcus jannaschii* Argonaute-Protein

MVLNKVITYKINAYKIKEEFIPKEVHFYRIKSFVNEAFNFYRFVNFYGGMIINKKDKSFVLPYKVDNKNVLKYKDG
 NNEIPIDIEYIKSLKLEYVKPEIAEKLVRGYLKS VHKIEPELSRIIKNIRKHKVVENIKVESYCEYEVKKHGDGYLLIL
 NFRHTASITKHLWDFVNRDKALLEEYVGKKIIFKPNPKVRYTISLVDAPNPQKIEEIMSHIIKYYKWS E DMVKS
 TFGEIDYNQPIMYCEEILEPFAPQFCNLVFYMD ELDSYILKELQSYWRLSNENKGKII NEIAKKLRFIDNTPKEL
 EFMKFNNTPLLVKDVNKNPTKIYSTNTLFTWIYNQNAKIYLPYDVPEIIRNKNLLTYILIDEEIKDELKAIKDKV
 NKMFRNYNKIANKTELPKFNYANRWKYFSTDDIRGIIKEIKSEFNDEICFALIIGKEKYKDNDYIEILKKQLFDL
 KIISQNILWENWRKDDKGYMTNNLLIQIMGKLGIKYFILD SKTPYDYIMGLDTGLGIFGNHRVGGCTVVYDS
 EGKIRRIQPIETPAPGERLHLPYVIEYLENKANIDMENKNILFLRDGFIQNSERN DLKEISKELNSNIEVISIRKN
 NKYKVFTSDYRIGSVFGNDGIFLPHKTPFGSNPVKLSTWLRFNCGNEEGLKINESIMQLLYDLTKMNY S ALY
 GEGRYLRIPAPIHYADKFVKALGKNWKIDEELLKHGFLYFI

7.3. Bindungsstudie von MjAgo mit DNA-Leitstrang

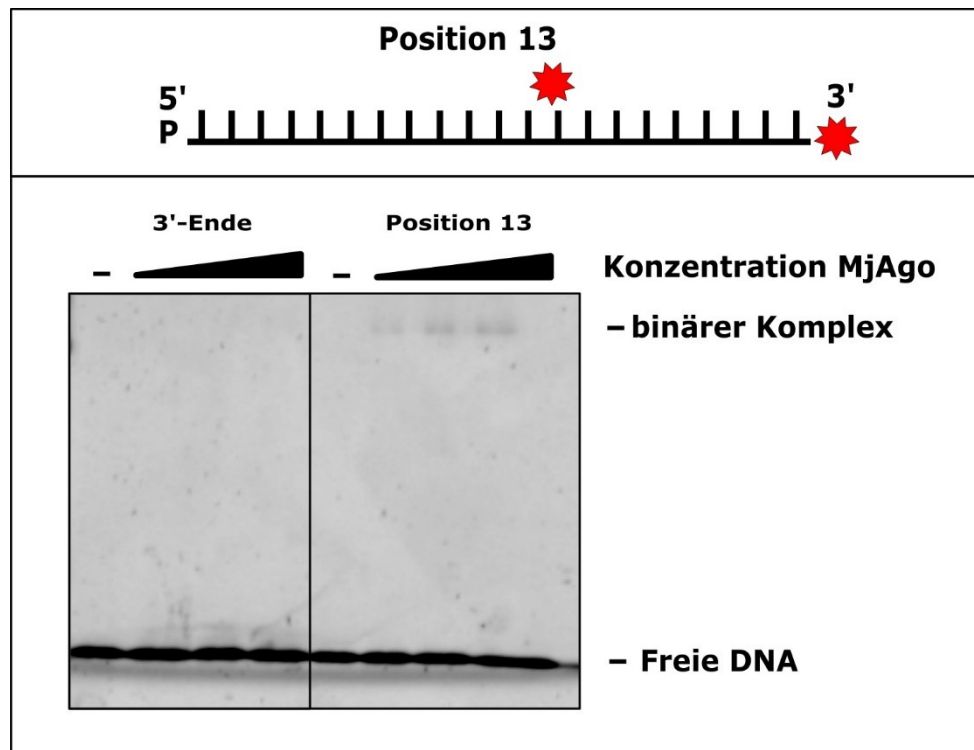


Abb. 7.3-1. Bindungsassay von MjAgo mit T-Leitstrang. Es wurden 0, 1, 3 und 5 μM MjAgo zusammen mit 333 nM T-Leitstrang bei 65°C für 10 Minuten inkubiert und nach Zugabe von Ficoll400-Ladepuffer über 10%ige native Polyacrylamidgelelektrophorese separiert. Der Farbstoff Atto550 befindet sich an der angegebenen Position des Leitstrangs. P ist eine Phosphatgruppe am 5'-Ende der DNA. Bei Positionierung des Farbstoffs am 3'-Ende des Leitstrangs ist die Bildung des binären Komplexes annähernd vollständig unterdrückt.

7.4. Reinigung der MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure

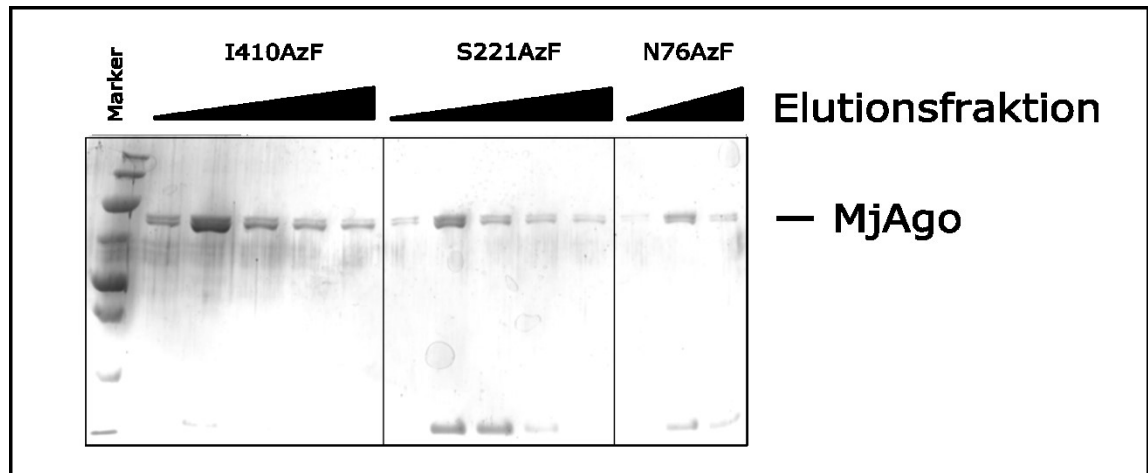


Abb. 7.4-1. SDS-PAGE mit Coomassiefärbung der Elutionsfraktionen der IMAC der MjAgo-Derivate mit unnatürlicher Aminosäure. Es wurde das Aufschluss- und Reinigungsprotokoll des Wildtyps verwendet, allerdings wurde die Hitzedenaturierung bei 75°C durchgeführt. Leichte Verunreinigungen im niedermolekularen Bereich wurden nicht von Fluorophoren markiert.